

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. - J. Sinell

**Versuche zum serologischen Nachweis
der Erhitzung von Kochschinken**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Rüdiger Schmoldt
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1969
11111111
Journal Nr. 675



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. - J. Sinell

**Versuche zum serologischen Nachweis
der Erhitzung von Kochschinken**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von

Rüdiger Schmoldt

Tierarzt aus Berlin

Berlin 1969

Journal Nr. 675

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. K. Bronsch
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Lerche

Tag der Promotion: 9. Juli 1969



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	3
II. <u>Literatur</u>	4
1. Erhitzung von Kochschinken.....	4
2. Die Hitzedenaturierung der Proteine, insbesondere der Sarkoplasmaproteine.....	6
3. Bekannte Verfahren zum Nachweis der Erhitzung in Fleischerzeugnissen	10
III. <u>Eigene Versuche</u>	14
A. Material und Methodik	14
1. Antigenherstellung und Immunisierung....	14
1.1 Antigene	14
1.2 Immunisierung	15
1.3 Titerbestimmung	17
2. Immunelektrophorese	18
3. Untersuchungsmaterial	19
3.1 Proben eigener Herstellung	19
3.2 Proben des Handels	19
4. Erhitzung der Proben eigener Herstellung	20
5. Extrakterstellung und Untersuchung	21
5.1 Extrakte der Proben eigener Herstellung	21
5.2 Extrakte der Proben des Handels	21
6. Untersuchung äußerer Einflüsse auf das immunelektrophoretische Erhitzungs- nachweisverfahren	22
6.1 Einfluß des Nitrits	22
6.2 Einfluß der Austrocknung des Untersuchungsmaterials	22
B. Ergebnisse	24
1. Immunisierung	24
1.1 Röhrchenpräzipitation	24
1.2 Überprüfung in der Immunelektro- phorese	26

	Seite
2. Untersuchung der Proben eigener	
Herstellung	29
2.1 Extrakte	29
2.2 Röhrchenpräzipitation	30
2.3 Immunelektrophorese	32
2.3.1 Erhitzung mit kurzer	
Anstiegszeit	35
2.3.2 Erhitzung mit langer	
Anstiegszeit	36
2.3.3 Einfluß der Pökelung	39
2.3.4 Einfluß des Extraktions-	
mittels	41
2.3.5 Einfluß der Austrocknung	
des Untersuchungsmaterials...	41
3. Untersuchung der Proben des Handels ...	42
IV. Diskussion	47
V. Zusammenfassung	53
VI. Literaturverzeichnis	55

I. Einleitung

In der Behandlungsverfahrenverordnung vom 12. 2. 1961 ist festgelegt, daß Fleisch nicht mehr als frisch anzusehen ist, wenn in allen Teilen eine Temperatur von + 65°C eingewirkt hat. Dies trifft auch für Kochschinken zu, der gepökelt und erhitzt in den Verkehr gebracht wird und dessen Haltbarkeit maßgeblich von der ausreichenden Erhitzung bestimmt wird.

Der vorläufige Entwurf für Dosenschinken der Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission sieht die Erhitzung bei Dosenschinken dann als ausreichend an, wenn im Kern eine Temperatur von + 65,5°C erreicht worden ist.

Um die Einhaltung dieser Vorschriften zu prüfen, ist in der Lebensmittelüberwachung und bei Qualitätskontrollen eine Methode zum Nachweis ausreichender Erhitzung notwendig. Derartige Nachweise sind in der Literatur beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Möglichkeit eines Erhitzungsnachweises in Kochschinken mittels serologischer Methoden zu überprüfen; insbesondere soll untersucht werden, ob durch Anwendung der Immunelektrophorese detaillierte Aussagen über das Temperatur-Zeit-Geschehen, dem das Untersuchungsmaterial unterlegen hat, möglich sind.

II. Literatur

1. Erhitzung von Kochschinken

Kochschinken werden entweder im Wasserbad oder im Luftkochschrank erhitzt, wobei beide Verfahren gleichwertig sind, wenn es sich um einen Luftkochschrank mit starker aktiver Luftumwälzung handelt (GISSKE 1962).

Im allgemeinen sind 3 verschiedene Erhitzungsverfahren üblich (KOCH 1966, GISSKE 1960, 1962, SCHNIER 1962).

1. Beginn der Kochung für 20 bis 30 Minuten bei $+96$ bis $+100^{\circ}\text{C}$; anschließend Senkung der Kochtemperatur auf $+74$ bis $+76^{\circ}\text{C}$.
2. Gleichmäßige Kochung bei einer Temperatur von $+74$ bis $+76^{\circ}\text{C}$.
3. Die sogenannte abgestufte Erhitzung. Hierbei wird zu Beginn 10 bis 30 Minuten bei einer Temperatur von $+96$ bis $+100^{\circ}\text{C}$ gekocht; anschließend wird die Temperatur 210 bis 240 Minuten lang auf $+52$ bis $+54^{\circ}\text{C}$ gesenkt und danach auf $+74$ bis $+76^{\circ}\text{C}$ gesteigert und die Kochung bei dieser Temperatur zu Ende geführt.

Um hohe Gewichtsverluste und starken Geleeabsatz vor allem bei Dosenschinken zu vermeiden, sind die Hersteller bemüht, die Erhitzungstemperaturen und Erhitzungszeiten auf ein Mindestmaß zu beschränken, da die Saftabscheidung bei erhitztem Fleisch in hohem Maße von der Kochtemperatur und Kochzeit abhängt (HAMM und DEATHERAGE 1960). Auch ist der zulässige Geleeanteil bei Exportschinken auf 13 % begrenzt. Um eine ausreichende Pasteurisierung im Schinken zu erzielen, darf die Erhitzungstemperatur nicht beliebig herabgesetzt werden.

Nach in der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach durchgeführten Untersuchungen wird die bei Export-

Schinken notwendige Haltbarkeit erreicht, wenn im Kern des Schinkens eine Temperatur von mindestens $+63^{\circ}\text{C}$ mehr als 30 Minuten lang eingewirkt hat (CORETTI 1957, GISSKE 1962). Schinken, die in die USA exportiert werden sollen, müssen eine fünftägige Bebrütung bei $+37^{\circ}\text{C}$ ohne Veränderungen aus halten (LIENHOP 1967, KOCH 1966). GISSKE (1960, 1962) untersuchte die einzelnen Erhitzungsverfahren im Hinblick auf Kerntemperatur und Geleeabsatz und empfahl als günstigste Methode das Verfahren, bei dem die Erhitzung bei gleichbleibender Wasserbad- oder Luftkochschranktemperatur von $+74$ bis $+76^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wird.

Die sogenannte abgestufte Erhitzungsmethode ist völlig abzulehnen. Sie hat den Nachteil, daß die Kerntemperatur im Bereich von $+20$ bis $+45^{\circ}\text{C}$ sehr langsam ansteigt. In diesem Zeitraum vermehren sich die Keime im Schinken stark, was zu einer wesentlichen Steigerung des Anfangskeimgehaltes führt. Dies wirkt sich nachteilig auf die Haltbarkeit des Schinkens aus, da auch durch die nachfolgende stärkere Erhitzung stets nur ein Teil der vorhandenen Keime abgetötet wird. Eine Minderung des Geleeabsatzes gegenüber den anderen Erhitzungsarten tritt ebenfalls nicht ein (GISSKE 1960, 1962); SCHNIER (1962) fand bei so erhitzten Schinken sogar einen um 0,3 % höheren Geleeabsatz.

Die Erhitzungsdauer richtet sich nach der Größe der Schinken und beträgt bei Kochungen im Wasserbad mit einer Temperatur von $+74^{\circ}\text{C}$ bis $+76^{\circ}\text{C}$ etwa 60 bis 65 Minuten pro Kilogramm Schinken (REUTER 1957). KOCH (1966) schlägt bei Erhitzung in Heißluftkochanlagen bei $+78^{\circ}\text{C}$ und 100 % Feuchte 50 Minuten pro Kilogramm Schinken vor.

Die Erhitzung ruft an den Muskeleiweißen Veränderungen hervor, die unter dem Begriff der Hitzedenaturierung zusammengefaßt werden.

2. Die Hitzedenaturierung der Proteine, insbesondere der Sarkoplasmaproteine

Unter Denaturierung versteht man jede Einwirkung auf das Eiweiß, die zu einer Änderung oder Zerstörung seiner Sekundär- oder Tertiärstruktur führt (KAUZMANN 1956).

Im nativen Eiweiß sind die Peptidketten spiralförmig angeordnet. Die nebeneinander liegenden Gänge dieser Spirale sind durch Salz- und Wasserstoffbrücken sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen auf bestimmte, jedem Protein eigentümliche Weise verbunden (sogenannte α -Helix Struktur nach PAULING 1958).

Erwärmung im wässrigen Medium führt oberhalb einer charakteristischen Schmelztemperatur zu einer Sprengung dieser intramolekularen Brücken, wonach es zum Aufrollen der Spirale kommt, so daß aus der nativen, geordneten Struktur eine willkürliche, ungeordnete Konfiguration entsteht (STAUFF 1960, HAUROWITZ 1960a, JAENICKE 1965).

Von der Denaturierung zu trennen ist das Phänomen der Wärmeaggregation, die als Koagulation sichtbar wird. Hierbei kommt es zu intermolekularer Betätigung der im nativen Zustand intramolekular abgesättigten Nebenvalezen und Disulfidbrücken, wodurch Verbindungen zwischen benachbarten Molekülen entstehen und dadurch eine Erhöhung des Partikelgewichts erfolgt. Wärmedenaturierung und Wärmeaggregation bedingen einander nicht notwendig (JAENICKE 1965).

Eine Reihe von physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des Proteins wird durch die Denaturierung verändert. Hierzu gehören definitionsgemäß (FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ 1951, HAUROWITZ 1960a, STAUFF 1960, JAENICKE 1965) auch die Verminderung der Löslichkeit, der Verlust der enzymatischen Aktivität und der serologischen Spezifität. Durch die Denaturierung wird der Antigencharakter des Proteinmoleküls zerstört, so daß es mit einem gegen das native Protein gerichteten Antikörper

keinen Antigen-Antikörper-Komplex mehr bildet (HAUROWITZ 1960b). Hierauf sind die Schwierigkeiten bei der "biologischen Eiweißdifferenzierung" in hocherhitzten Fleischwaren zurückzuführen (OBERMEYER u. PICK 1903, 1906, SCHMIDT, W.A. 1908, FORNET u. MÜLLER 1910, ROSENBERG 1926, 1928, SINELL 1961, 1962, 1968, SINELL u. MENTZ 1969).

Bevor der Einfluß der Hitzedenaturierung auf die Muskelleiweiße diskutiert wird, soll eine kurze Übersicht über die Muskelproteine gegeben werden:

Die in Wasser oder in Salzlösungen geringer Konzentration löslichen Eiweiße sind im Sarkoplasma enthalten. Die übrigen Muskelproteine bilden das fibrilläre Eiweiß. Diese Proteine sind schwer löslich. Für die nachfolgenden Untersuchungen sind sie von geringem Interesse, weshalb auf sie nicht näher eingegangen werden soll.

Die Sarkoplasmaproteine wurden früher in vier Fraktionen aufgeteilt (MEYER u. WEBER 1933, WEBER u. STÖVER 1933, BATE-SMITH 1938, WEBER 1950, BOSCH 1951):

In die Myogen-, Myoalbumin- und Myoglobin - Fraktion, die wasserlöslich sind und in die nur in Salzlösungen lösliche Globulin X - Fraktion.

Spätere Untersuchungen, die z. T. mit verfeinerten Trennmethoden, wie z.B. Elektrophorese, Ultrazentrifugation und Säulenchromatographie durchgeführt wurden, haben jedoch gezeigt, daß zumindest "Myogen" und Globulin X" keine einheitlichen Proteine sind, sondern daß es sich um Gemische von ähnlichen Muskeleiweißstoffen handelt (BARANOWSKI 1939, TAYLOR und Mitarbeiter 1948, BEISENHERZ und Mitarbeiter 1953, JACOB 1947, DWORNIKOWA 1954, IWANOW und Mitarbeiter 1960, SCOPES 1964, FUJIMAKI u. DEATHERAGE 1964, GILES 1962, 1965). SCOPES (1964) konnte bei elektrophoretischen Untersuchungen von Sarkoplasmaproteinen

regelmäßig 30 Banden beobachten. Den größten Teil der Sarkoplasmaproteine bilden die verschiedenen Muskelenzyme, (TAYLOR und Mitarbeiter 1948, BEISENHERZ und Mitarbeiter 1953, DWORNIKOWA 1954, KRONMAN und Mitarbeiter 1960, SCOPES 1964, FUJIMAKI und DEATHERAGE 1964, GILES 1965), die vor allem dem geregelten Ablauf der Glykogenolyse dienen (HAMM 1952, GRAU 1969), bis heute aber noch nicht in allen Einzelheiten bekannt sind.

Myoglobin ist der rote Muskelfarbstoff, ein Chromoprotein, das mit dem Hämoglobin verwandt, jedoch nicht identisch ist (KESZTYÜS und VÁRTERESZ 1945). Es ist wie das Hämoglobin in der Lage, Sauerstoff anzulagern, ohne dabei zu oxydieren. Bei der Pökellung entsteht aus dem Myoglobin rotes Nitrosomyoglobin, das beim Erhitzen zu schwer löslichem Nitrosochromogen umgewandelt wird und dem Fleisch die rote Farbe erhält (GRAU 1969).

Die Angaben darüber, bei welchen Temperaturen die Sarkoplasmaproteine denaturiert werden, sind unvollständig. Das ist auch verständlich, denn die Denaturierung ist kein "Alles-oder-Nichts"-Vorgang, sondern der Übergang vom nativen zum denaturierten Zustand erfolgt fließend (HAUROWITZ 1960a). Denaturierung und Koagulation können durch gewisse Stoffe oder Bedingungen gehemmt werden. Hierzu zählen Zucker, fettsaure Salze, Farbstoffe und hohe Drucke (GRAU 1969). Nach WEBER (1934) und SHERMAN (1961) hängen Koagulationstemperatur der löslichen Muskeleiweiße, die Form des Koagulums und die Wasserabscheidung von der Natur, der Konzentration und dem pH-Wert der wässrigen Lösung ab, in der die Erwärmung vor sich geht. Die Hitze-koagulation tritt z. B. in alkalischen Phosphatlösungen später ein als in Kochsalzlösungen (SHERMAN 1961). Das Verhalten der Sarkoplasmaproteine beim Erwärmen wird auch von den Struktureiweißen beeinflusst, denn die Sarkoplasmaeiweiße verhalten sich beim Erhitzen von Muskelpreßsaft anders als beim Erhitzen des ganzen Muskelstücks (HAMM 1966, LEE und GRAU 1966).

Das bedeutet, daß die häufig am Muskelpreßsaft durchgeführten Studien über die Wärmedenaturierung der Sarkoplasmaproteine den Verhältnissen beim Erhitzen von Fleisch nicht entsprechen müssen. Schließlich soll auch die Erhitzungsgeschwindigkeit für den Eintritt von Denaturierung und Koagulation bedeutungsvoll sein. Die Denaturierungstemperatur liegt um so niedriger, je rascher der Temperaturanstieg erfolgt (COHEN 1966).

Die Temperaturbereiche, in denen die einzelnen Sarkoplasmafraktionen denaturieren, werden in der Literatur annähernd übereinstimmend angegeben. Wärmedenaturierung und Koagulation beginnen bereits bei $+40^{\circ}\text{C}$ (HAMM 1965). Über $+50^{\circ}\text{C}$ wird der größte Teil der Sarkoplasmaeiweiße unlöslich (LEE und GRAU 1966). Zwischen $+50^{\circ}$ und $+70^{\circ}\text{C}$ liegt nach GRAU (1969) der Bereich der stärksten Wärmekoagulation. Bei $+65$ bis $+66^{\circ}\text{C}$ soll die Denaturierung fast abgeschlossen aber noch nicht vollständig beendet sein (HAMM und DEATHERAGE 1960). Nach dem Erwärmen auf $+60^{\circ}\text{C}$ sind nur noch 23 % der bei $+20^{\circ}\text{C}$ löslichen Proteine extrahierbar (HAMM und DEATHERAGE 1960). CORETTI (1957) gibt $+63^{\circ}\text{C}$ bis $+65^{\circ}\text{C}$ als Denaturierungsbereich für die Myogenfraktion an; GRAU (1969) hält die Albumine bereits bei $+60^{\circ}\text{C}$ für vollständig denaturiert.

Wie bereits ausgeführt wurde, ist u. a. die Verminderung bzw. der Verlust der Löslichkeit ein Zeichen für die eingetretene Denaturierung eines Proteins. Da nun aber nur gelöste Eiweißstoffe die Fähigkeit besitzen, im elektrischen Feld zu wandern, so läßt sich durch die elektrophoretische Untersuchung von Extrakten aus Muskulatur, die vorher auf bestimmte Temperaturen erhitzt worden ist, feststellen, welche Fraktion in dem betreffenden Temperaturbereich unlöslich geworden ist. Die dieser unlöslich gewordenen Fraktion entsprechende Bande fehlt dann im elektrophoretischen Bild. Beim Erhitzen von Fleisch auf $+50^{\circ}\text{C}$ verschwindet im Elektropherogramm die Globulingruppe, die Löslichkeit wird beim Erhitzen auf $+60^{\circ}\text{C}$ weiter

vermindert, und bei $+70^{\circ}\text{C}$ sind nur noch Spuren löslicher Eiweißstoffe vorhanden. Bei Temperaturen über $+80^{\circ}\text{C}$ treten neue Banden im Elektropherogramm hervor. Bei diesen Stoffen soll es sich um Abbauprodukte des Kollagens in der Hauptsache um Gelatine handeln (GRAU 1969). Das Verhalten des löslichen Stickstoffs beim Erhitzen ist analog. Der lösliche N sinkt schnell mit steigender Temperatur bis $+60^{\circ}\text{C}$, langsam weiter bis zum Kochpunkt und steigt bis $+110^{\circ}\text{C}$ wieder etwas an (HASHIMOTO und YASUI 1957).

Gelänge es nun, die durch die Denaturierung veränderten Eigenschaften der Muskelproteine nachzuweisen, so wäre damit ein Erhitzungsnachweis möglich.

3. Bekannte Verfahren zum Nachweis der Erhitzung in Fleischerzeugnissen

In der Milchüberwachung hat sich seit langem die Feststellung des Verlustes bestimmter Enzymaktivitäten als Erhitzungsnachweis bewährt. Diese Methode ist zum Nachweis der Erhitzung von Fleischerzeugnissen ebenfalls untersucht worden. v. LIEBERMANN und FREUND (1923) schlugen die Katalaseprobe vor. Fünf Minuten langes Erhitzen führt bei Rind-, Pferde- und Fischfleisch bei $+80^{\circ}\text{C}$, bei fettreichem Schweinefleisch dagegen erst bei $+90^{\circ}\text{C}$ zur Zerstörung der Katalase, so daß es beim Übergießen von so erhitztem, zerkleinertem Material mit 3 %iger Wasserstoffperoxydlösung zu keiner Gasbildung mehr kommt (RUST 1949). Völlig unzuverlässig wird die Katalaseprobe, wenn es nach dem Erhitzen zu einer Ansiedlung und Vermehrung von Bakterien gekommen ist. Da die meisten aeroben Keime Katalase bilden, ist eine Unterscheidung zwischen unzureichender Erhitzung oder nachträglicher bakterieller Verunreinigung nicht möglich (SCHÖNBERG 1947). EYERMANN (1955) prüfte, ob durch den Nachweis der Inaktivierung der Peroxydase eine ausreichende

Erhitzung festzustellen ist. Stets sind im Fleisch aber sogenannte Pseudoperoxydasen vorhanden, zu denen Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrome gehören. Diese werden erst bei wesentlich höheren Temperaturen als die echte Peroxydase inaktiviert, so daß diese Methode keine exakten Ergebnisse liefern kann (NASR, PURR und KOTTER 1962). Dazu kommt, daß der Peroxydase-Gehalt im Fleisch durch Lagerung vermindert wird.

Nach KÖRMENDY und GANTNER (1960, 1967) ist die Hitzeinaktivierung der sauren Phosphatase als objektiver Erhitzungsnachweis in Dosenschinken verwendbar. Eine Verminderung der Aktivität oder Reaktivierung während der Lagerung tritt bei diesem Enzym nicht ein; jedoch beeinflussen der Kochsalzgehalt und der pH-Wert seine Hitzeinaktivierung. Ebenso wirken die in manchen Ländern als Zusatzstoffe verwendeten Mono- und Diphosphate als Inhibitoren der Hitzeinaktivierung der sauren Phosphatase; gleichzeitig hemmen sie aber auch deren Enzymaktivität. Diese beiden entgegengesetzt wirkenden Eigenschaften der Phosphate sollen sich allerdings aufheben, so daß sie unberücksichtigt bleiben können. Bei exakter Anwendung standardisierter Bedingungen soll die Methode in der Praxis brauchbar sein (GANTNER und KÖRMENDY 1968). Auch LIND (1965) hält dieses Verfahren für erfolgreich und gut reproduzierbar; er beschreibt die Funktion von Phosphatase-Aktivität und Kerntemperatur als linear im Bereich zwischen $+65^{\circ}\text{C}$ und $+70^{\circ}\text{C}$ bei Dosenschinken. Zu einem anderen Ergebnis gelangten ŠŮVAKOV und Mitarbeiter (1967), die in dem von ihnen untersuchten Temperaturintervall von $+66^{\circ}\text{C}$ bis $+73,1^{\circ}\text{C}$ keine Abhängigkeit zwischen erreichter Kerntemperatur und Phosphataseaktivität feststellen konnten.

Ein anderer enzymatischer Erhitzungsnachweis in Fleisch-erzeugnissen ist auf der Basis des Carbesterase Nachweises ausgearbeitet worden (NASR und Mitarbeiter 1962, MATHIES 1966, PFEIFFER und Mitarbeiter 1969). Unter den

verschiedenen Carbesterasen in der Skelettmuskulatur und im Bindegewebe ist es wohl die Arylesterase, die besonders hitzeresistent ist. Sie wird bei $+80^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 15 bis 20 Minuten völlig inaktiviert. Ob auch die Carbesterasen durch verschiedene pH-Werte, Kochsalzgehalt oder andere bei der Erhitzung anwesende Elektrolyte oder Milieueinflüsse verändert werden, ist aus der Literatur nicht ersichtlich.

Die bei der Hitzedenaturierung eintretende Löslichkeitsverminderung der Sarkoplasmaeiweiße verwendete CORETTI (1957) zum Nachweis der erfolgten Erhitzung in Dosschinken. Ist bei der Erhitzung des Schinkens im Kern eine Temperatur von $+63^{\circ}\text{C}$ nicht erreicht worden, so lassen sich noch nicht denaturierte Eiweißkörper der Myogenfraktion extrahieren. Bei einer anschließenden Erhitzung dieses Extraktes für 15 Minuten auf $+65^{\circ}\text{C}$ kommt es dann zu einer mit bloßem Auge erkennbaren fein- bis grobflockigen Ausfällung dieser vorher im nativen Zustand extrahierten Proteine. Hat dagegen bei der Erhitzung des Schinkens im Kern eine Temperatur von $+63^{\circ}\text{C}$ länger als 5 Minuten eingewirkt, so sind diese Eiweiße denaturiert, unlöslich und nicht mehr extrahierbar. Ein Extrakt aus einem so erhitzten Schinken bleibt dann bei anschließender Erhitzung klar. Nach LIND (1965) soll diese Koagulationsprobe jedoch bis zu 10°C niedrigere Werte anzeigen, als den tatsächlichen Temperaturen entspricht.

Auf dem gleichen Prinzip beruht die von COHEN (1966) vorgeschlagene Erhitzungsnachweismethode der elektrophoretischen Auftrennung von Extrakten aus Kochschinken. Ist der Schinken ausreichend erhitzt, so ist ein Teil der im unerhitzten Extrakt vorhandenen Proteine unlöslich geworden und nur fünf relativ hitzebeständige Fraktionen sind löslich geblieben. Aus der Intensität der diesen Fraktionen entsprechenden Banden im Pherogramm lassen sich Rückschlüsse auf die Erhitzung ziehen.

Nach SCHNEIDER und SZÖRÉNYI (1958) kann man auch den Verlust der serologischen Aktivität der Sarkoplasmaproteine zur Feststellung ausreichender Erhitzung verwenden. Wenn in den untersuchten Fleischproben Temperaturen über + 70°C länger als 30 Minuten lang eingewirkt haben, so konnten sie mit den verwendeten Antiseren in der Röhrchenpräzipitation nach UHLENHUTH kein Präzipitat mehr erkennen. Die Verfasser halten ein Fleischerzeugnis in diesem Fall für "ausreichend" erhitzt, weil gleichzeitig auch der Keimgehalt merklich abgesunken war.

Die beiden letzten, die von COHEN (1966) und von SCHNEIDER und SZÖRÉNYI (1958) vorgeschlagenen Methoden, lassen sich in der Immunelektrophorese kombinieren. Hierbei können mehrere Parameter zur Beurteilung der Hitzedenaturierung herangezogen werden: der Verlust der Löslichkeit, der serologischen Aktivität und die Veränderung von Ladungsgrößen. Über derartige Untersuchungen soll nachfolgend berichtet werden.

III. Eigene Versuche

A. Material und Methodik

1. Antigenherstellung und Immunisierung

1.1. Antigene

Das für die Immunisierung der Kaninchen Nr. 1 bis 10 verwendete Antigen wurde auf folgende Weise hergestellt:

Schlachtwarmes Schweinefleisch wurde von anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit und einmal im Fleischwolf (2 mm Scheibe) zerkleinert, in 250 ml Bechergläser gefüllt und im Wasserbad 30 Minuten lang bei $+56^{\circ}\text{C}$ Kerntemperatur inaktiviert. Anschließend wurde diese Fleischmasse nach der von BEHRENS (1952) vorgeschlagenen Methode mit Kohlensäureeis in der IKA-Mühle zerkleinert und lyophilisiert. Bis zur Verwendung erfolgte die Aufbewahrung im Exsiccator über Sicapent^(R). Diese lyophilisierte Muskulatur wird im folgenden mit S 56 M bezeichnet.

Die Kaninchen Nr. 11 bis 14 wurden mit einem Antigen immunisiert, das in Anlehnung an die von KOTTER und Mitarbeiter (1966) und DEGENKOLB und HINGERLE (1967) vorgeschlagene Methode hergestellt war. Wie oben hergerichtes und hitzeinaktiviertes Schweinefleisch wurde mit der doppelten Menge phys. NaCl-Lösung mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer bei $+4^{\circ}\text{C}$ 18 Stunden extrahiert, anschließend zentrifugiert und durch Faltenfilter filtriert. Dieser rötlich-braune Extrakt hatte einen nach der Biuret-Methode bestimmten Eiweißgehalt von 1,56g %. Zu 85 Teilen dieses Fleischextraktes

wurden 15 Teile einer 10 %igen Aluminiumhydroxydgel-Suspension der Firma Merck in Aqua dest. gegeben und jeweils 20 ml dieses Gemisches in 100 ml Bechergläsern lyophilisiert und wiederum bis zur Verwendung im Exsiccator über Sicapent^(R) aufbewahrt.

1.2 Immunisierung

Zur Immunisierung kamen Kaninchenbatarde ohne Berücksichtigung des Geschlechts mit einem Durchschnittsgewicht von 4 kg. Die Tiere waren etwa 6 Monate alt und klinisch gesund. Vor Beginn der Immunisierung wurde stets eine Probepräzipitation zwischen dem Serum des Versuchstieres und dem zu verwendenden Antigen vorgenommen, um unspezifisch reagierende Tiere vom Versuch auszuschließen; jedoch kam es bei keinem Kaninchen zu einer solchen Reaktion.

Die Immunisierung der ersten Kaninchengruppe (Nr. 1 bis 4) erfolgte mit einem Extrakt aus der lyophilisierten Muskulatur (S 56 M) zusammen mit FREUNDSchem Adjuvans (Bacto Adjuvant complete Freund der Firma DIFCO). 1 g S 56 M wurde mit 6 ml phys. NaCl-Lösung 24 Stunden bei +4°C extrahiert, 20 Minuten bei 12 000 U/min in der Kühlzentrifuge bei +4°C zentrifugiert und durch Faltenfilter (Schleicher & Schüll Nr. 595 ¹/₂) filtriert.

Am ersten Immunisierungstag erhielten die Kaninchen Nr. 1 bis 4 je 1 ml dieses Extraktes zusammen mit 1 ml FREUNDSchem Adjuvans vermischt i.c.; die Hälfte medial, die andere Hälfte lateral am Unterschenkel. Am 15. Tag erhielt jedes Tier 3 ml Antigen-Extrakt s.c., am 16. und 17. Tag je 3 ml i.v. in die Ohrvene. 7 Tage später erfolgte eine Titerüberprüfung. 14 Tage nach der letzten Injektion fand eine Boosterinjektion mit

2 ml Extrakt s.c. statt, um einen höheren Titer zu erzielen. Den gleichen Effekt sollte eine weitere Boosterinjektion mit 5 ml Extrakt i.p. 2 Monate nach der ersten Boosterinjektion haben. 1 Woche nach dieser letzten Injektion erfolgte eine erneute Titerüberprüfung, wonach die Tiere aus der Vena jugularis entblutet wurden. Die Gesamteiweißmenge bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt des Extraktes, die an die Kaninchen im Verlaufe der Immunisierungen verabreicht wurde, ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Bei der folgenden Immunisierung der Kaninchen Nr. 5 bis 7 sollte geprüft werden, ob sich durch geringere Injektionsdosen (bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt) und durch Extraktion der lyophilisierten Muskulatur (S 56 M) mit Phosphatpuffer pH 7,1 günstigere Ergebnisse erzielen lassen. 1 g S 56 M wurde 18 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit 6 ml Phosphatpuffer extrahiert. Im Übrigen erhielten diese Tiere eine Immunisierung ebenfalls mit FREUNDschem Adjuvans nach dem gleichen Modus wie die Kaninchen Nr. 1 bis 4. 7 Tage nach der letzten Injektion fand die Titerüberprüfung statt, wonach auch diese Kaninchen entblutet wurden.

Die Kaninchen Nr. 8 bis 10 wurden nach der von UHLENHUTH und SEIFFERT (1930) vorgeschlagenen Immunisierungsmethode ohne Adjuvans immunisiert. Sie erhielten 10 Injektionen von je 1 ml des gleichen S 56 M-Phosphatpufferextraktes wie die Kaninchen Nr. 5 bis 7 i.p. im Abstand von 2 bis 3 Tagen. Titerüberprüfung und Ausblutung erfolgten wiederum 7 Tage nach der letzten Injektion.

Die Kaninchen Nr. 11 bis 14 erhielten eine Immunisierung mit dem bereits beschriebenen nach den Angaben von KOTNER und Mitarbeitern (1966) und DEGENKOLB und HINGERLE (1967) hergestellten Lösungsgemisch, das Aluminiumhydroxyd als Adjuvans enthielt. Das in Bechergläsern lyophilisierte Gemisch wurde vor der Injektion mit der ursprünglichen Menge (20 ml) Aqua dest. gelöst und mit der gleichen Menge

phys. NaCl-Lösung verdünnt. Von diesem verdünnten Antigen-Lösungsgemisch bekamen die Tiere 15 Injektionen von je 10 ml s.c. im Abstand von 2 Tagen. 7 Tage nach der letzten Injektion erfolgten Titerüberprüfung und Ausblutung.

Seren, die sich als qualitativ hochwertig erwiesen hatten, wurden in Pools vereinigt. Der Pool P 1 bestand aus den Antiseren Nr. 4 und 5 und umfaßte etwa 60 ml; der Pool P 2 setzte sich aus den Antiseren Nr. 1 und 2 zusammen und bestand aus insgesamt 96 ml Antiserum. Bis auf Antiserum Nr. 7 wurden alle übrigen hergestellten Antiseren wegen zu geringer Qualität nicht für die folgenden Versuche verwendet.

1.3 Titerbestimmung

Die Titerbestimmung erfolgte mit der Röhrchenpräzipitationsmethode nach UHLENHUTH (1901) im α -Verfahren (DEAN und WEBB 1926). Dazu wurde das zu überprüfende Antiserum in Glasröhrchen (2,5 x 30 mm) mit den verdünnten Antigenen überschichtet.

Ausgehend von einer Verdünnung des Antigen-Extraktes mit einem Biuret Eiweißgehalt von 0,1 g % (= 1 : 1000) wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Kam es zu einer positiven Reaktion, so bildete sich an der Berührungsstelle von Antigen und Antiserum ein weißer Ring. Jedes Antiserum wurde nicht nur mit dem zur Immunisierung verwendeten S 56 M-Antigen (homologes Antigen) überprüft, sondern auch mit Verdünnungen von Schweineserum (SS), Schwein-Nativ-Muskelextrakt (SM) und mit verdünntem Extrakt aus Schweinemuskulatur, die vorher 30 Minuten auf +70°C (S 70 M) erhitzt worden war.

Als Titer jedes Antiserums wird diejenige Verdünnung des homologen Antigens (S 56 M) angegeben, bei der nach 20

Minuten Reaktionszeit gerade noch ein ringförmiges Präzipitat im Röhrchen gegen einen dunklen Hintergrund erkennbar war.

Für die nachfolgenden Untersuchungen waren Antiseren notwendig, die gegen eine möglichst große Anzahl von Muskel-eiweißfraktionen Antikörper enthielten. Für eine zuverlässigere Bestimmung der Qualität wurden deshalb die Antiseren auch noch in der Immunelektrophorese überprüft.

2. Immunelektrophorese

Die folgenden Versuche wurden mit der Immunelektrophorese - Ausrüstung 6800 A der Firma LKB Stockholm nach der dazugehörigen Arbeitsanleitung durchgeführt. Diese Apparatur ermöglicht immunelektrophoretische Untersuchungen im Agar Gel nach der von SCHEIDEGGER (1955) entwickelten Mikromethode auf einem Objektträger. Die Objektträger wurden gleichmäßig mit einer 1 %igen, gepufferten (Veronal-Puffer, pH 8,6) Agarschicht (Spezial-Agar Nobel, DIFCO) versehen, aus der zwei runde Antigenbassins mit einem Durchmesser von 1 mm und eine dazwischen liegende 1 mm breite und 65 mm lange Rinne ausgestanzt wurden. Nach Einfüllen von jeweils 1 bis 2 μ l des zu untersuchenden Extraktes in die Bassins erfolgte 1 Stunde lang die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 250 V. Danach wurden etwa 0,04 ml Antiserum in die zwischen den beiden Antigenbassins liegende Rinne gefüllt. Dieses Antiserum diffundierte im Agar-Gel gegen die vorher aufgetrennten Untersuchungsextrakte. Nach 20 Stunden wurde die Reaktion unterbrochen. Um sämtliches überschüssiges, nicht präzipitiertes Eiweiß zu entfernen, wurden die Objektträger 20 Stunden lang in phys. NaCl-Lösung getaucht und anschließend 1 Stunde in Aqua dest. gewässert. Nach

dem vollständigen Trocknen der Präparate erfolgte die Anfärbung der entstandenen Präzipitate mit Amidoschwarz.

Beurteilt wurde das untersuchte Material nach der Lokalisation, dem Verlauf, der Länge und der Intensität der Präzipitate.

3. Untersuchungsmaterial

3.1 Proben eigener Herstellung

Rohe, unerhitzte, spritzgepökelte Schinken mit verschiedenen Salz- und Wassergehalten sowie rohes, ungepökeltes Schweinefleisch wurden verschieden lange auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt.

Schinken I enthielt 2,4 % NaCl; bezogen auf die Trockensubstanz: 10,2 % (als Schinken mit mittlerem Salzgehalt bezeichnet).

Schinken II hatte den gleichen NaCl- und Wassergehalt wie Schinken I.

Schinken III enthielt 6,9 % NaCl; bezogen auf die Trockensubstanz: 22 % (als Schinken mit hohem Salzgehalt bezeichnet).

Schinken IV enthielt 1,6 % NaCl; bezogen auf die Trockensubstanz: 6,7 % (als Schinken mit niedrigem Salzgehalt bezeichnet).

Die Bestimmung des Wasser- und Kochsalzgehaltes erfolgte nach der von der ISO empfohlenen Methode.

3.2 Proben des Handels

Zur Untersuchung gelangten 100 Kochschinkenproben mit und ohne Fett und Schwarte aus Berliner Fleischereien, Filialgeschäften und Warenhäusern. Bevorzugt wurden

ca. 1 cm dicke Scheiben aus der Mitte der ganzen Schinken; doch auch vorverpackte Ware aus Fleischfabriken fand Berücksichtigung. Aus dem Zentrum der Schinkenscheiben wurden jeweils 5 g Material zur Herstellung des Extraktes verwendet.

4. Erhitzung der Proben eigener Herstellung

Je 25 g entsehtes, entfettetes und im Fleischwolf (4 mm Scheibe) zerkleinertes Material (vgl. 3.1) wurde in Reagenzgläser mit einem Innendurchmesser von 20 mm verbracht, zur Vermeidung von Luftblasen fest zusammengepreßt und in das Zentrum zur Kontrolle der Kerntemperatur ein Thermometer eingeführt. Die Erhitzung erfolgte im Wasserbad auf $+55^{\circ}$, $+60^{\circ}$, $+63^{\circ}$, $+65^{\circ}$, $+68^{\circ}$, $+70^{\circ}$, $+73^{\circ}$ und $+75^{\circ}\text{C}$. Bei jeder dieser Temperaturen betrug die Erhitzungsdauer, gemessen vom Zeitpunkt der Erreichung der gewünschten Kerntemperatur an, jeweils 15, 30, 60 und 120 Minuten. Auch die Anstiegszeiten wurden variiert; dies geschah dadurch, daß die Proben entweder in heißes Wasser mit der zu erreichenden Kerntemperatur (kurze Anstiegszeit) oder in kaltes Wasser ($+7^{\circ}\text{C}$) gestellt wurden, das anschließend langsam erhitzt wurde. Die kurze Anstiegszeit betrug bei den auf $+55^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben 7 Minuten und steigerte sich bis auf 12 Minuten bei den auf $+75^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben. Die Anstiegszeit bei den langsam erhitzten Proben wurde zweifach variiert; sie lag einmal zwischen 47 (60°C) und 62 (75°C) Minuten und bei einem zweiten Versuch zwischen 160 (60°C) und 199 (75°C) Minuten. Nach beendeter Erhitzung wurden die Proben etwa 2 Stunden lang in kaltem Wasser gekühlt.

5. Extraktherstellung und Untersuchung

5.1 Extrakte der Proben eigener Herstellung

Nach vollständiger Abkühlung wurden die erhitzten Proben und unerhitzte Kontrollen zusammen mit der gleichen Menge Extraktionsflüssigkeit (25 ml) 30 Sekunden lang mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Als Extraktionsflüssigkeit dienten:

1. Aqua dest.
2. phys. NaCl - Lösung
3. Phosphatpuffer pH 7,15
4. nur bei ungepökeltem Schweinefleisch
2,5 %ige NaCl - Lösung.

Die Extraktion erfolgte 18 Stunden lang bei +4°C, am nächsten Tag folgten 20 Minuten Zentrifugieren mit 12 000 U/min. in der Kühlzentrifuge und Filtration des Überstandes durch Faltenfilter (Schleicher & Schüll Nr.595 1/2). Diese Extrakte wurden nach Bestimmung des Biuret-Eiweißgehalts, des pH-Wertes und des Kochsalzgehalts in der Immunelektrophorese unverdünnt untersucht. Für die Röhrchenpräzipitation nach UHLENHUTH wurden sie auf 0,1 g % Eiweißgehalt eingestellt und wie oben beschrieben austitriert.

5.2 Extrakte der Proben des Handels

Die aus dem Zentrum der Proben entnommenen 5 g Material wurden mit gleicher Menge Aqua dest. mit dem Ultra-Turrax 30 Sekunden lang homogenisiert, dann wie die Proben eigener Herstellung extrahiert, zentrifugiert, filtriert und anschließend in der Immunelektrophorese untersucht.

6. Untersuchung äußerer Einflüsse auf das immunelektrophoretische Erhitzungsnachweisverfahren

6.1 Einfluß des Nitrits

Unterschiede zwischen den Pherogrammen von gepökeltem und ungepökeltem Untersuchungsmaterial veranlaßten nachfolgenden Versuch über den Einfluß des Nitrits. Das im Fleisch vorhandene Myoglobin sollte durch Nitritzugabe - wie bei der Pökelung - zu Nitrosomyoglobin umgewandelt werden. Nach dem Vorschlag von GRAU (1969) wurden 250 mg NaNO_2 und 1 g Ascorbinsäure (als Reduktionsmittel) in 1 ml Aqua dest gelöst und mit 25 g entsehtem, entfettetem und zerkleinertem Schweinefleisch homogenisiert. Zum Vergleich erfolgte die Homogenisierung einer zweiten, gleichartig hergestellten Schweinefleischprobe nur mit 1 ml Aqua dest. ohne Nitrit- und Ascorbinsäurezusatz. Beide Proben wurden anschließend 4 Stunden lang im Wasserbad bei einer Temperatur von $+45^\circ\text{C}$ inkubiert und danach mit je 24 ml Aqua dest. erneut homogenisiert. Die folgende Extraktion, Zentrifugation, Filtration und weitere Untersuchung erfolgte dann wie unter 5.1 beschrieben.

6.2 Einfluß der Austrocknung des Untersuchungsmaterials

3 etwa 1 cm dicke, rohe, gepökelte Schinkenscheiben wurden unter Vakuum in Plastikfolien eingeschmolzen und 40 Minuten lang im Wasserbad mit einer Temperatur von $+68^\circ\text{C}$ erhitzt. Je eine Hälfte dieser Scheiben kam sofort, wie unter 5.2 beschrieben, zur Untersuchung, während die anderen Hälften 72 Stunden lang in einem Exsiccator unter Vakuum über Sicapent^(R) getrocknet wurden. Danach wurden wiederum 5 g Material entnommen,

mit der dreifachen Menge Aqua dest. homogenisiert, dann wie unter 5.1 beschrieben extrahiert, zentrifugiert und filtriert und der Extrakt in der Immunelektrophorese untersucht.

B. Ergebnisse

1. Immunisierung

1.1. Röhrchenpräzipitation

Für die Qualität eines Antiserums sind die Spezifität und die Höhe des homologen Titers maßgebend. Der homologe Titer der Antiseren 1 und 2 betrug 1 : 32000. Dieser Titer war bereits bei der ersten Titerüberprüfung vorhanden, die folgenden Boosterinjektionen bewirkten keine Titererhöhung. Anders verhielt es sich bei den gleichzeitig immunisierten Tieren 3 und 4. Hier wurde durch die Boosterung eine Titererhöhung um jeweils eine Verdünnungsstufe erreicht. Das Antiserum Nr. 3 hatte einen homologen Titer von 1 : 8000 und Antiserum Nr. 4 präzipitierte das homologe Antigen S 56 M bis zu einer Verdünnung von 1:16000. Bei allen 4 Antiseren war der Titer gegen S 70 M geringer, Nativ-Muskelextrakt präzipitierten die Antiseren Nr. 2 und 3 bis zur gleichen Verdünnungsstufe wie das homologe Antigen; bei den Antiseren Nr. 1 und 4 dagegen war der Titer gegen SM um eine Verdünnungsstufe niedriger. Gegenüber Schweineserum (SS) hatten alle vier Antiseren einen wesentlich höheren Titer als gegen S 56 M. Bei den Tieren Nr. 5 bis 7 konnten mit geringeren Injektionsdosen gegenüber den Kaninchen Nr. 1 bis 4 keine höheren Titer erzielt werden. Die Antiseren Nr. 5 bis 7 waren den Antiseren Nr. 1 und 2 qualitativ gleichwertig. Die Extraktion der lyophilisierten auf +56°C erhitzten Schweinemuskulatur mit Phosphatpuffer pH 7,15 brachte gegenüber der Extraktion mit phys. NaCl-Lösung keine Erhöhung des Extrakteiweißgehaltes. Die bei diesen Tieren durchgeführten Boosterinjektionen führten zu keiner Titererhöhung.

Tabelle 1

Kaninchen bzw. Anti- serum Nr:	A N		T	I	G	E	N	T		I	T	E	R	SS
	Schwein 56°- Muskulatur Gesamtdosis		Extraktions- mittel		Adjuvans		S56M	S70M	SM					
1	231 mg		phys. NaCl		Bacto		1:32000	1:8000	1:16000	1: 64000				
2	231 mg		phys. NaCl				1:32000	1:8000	1:32000	1:256000				
3	231 mg		phys. NaCl		Adjuvant,		1: 8000	1:1000	1: 8000	1: 64000				
4	231 mg		phys. NaCl		complete		1:16000	1:4000	1: 8000	1:128000				
5	70 mg		Phosphat - puffer				1:32000	1:8000	1:16000	1:512000				
6	70 mg		Phosphat - puffer		FREUND		1:16000	--	1: 1000	1: 64000				
7	70 mg		Phosphat - puffer				1:32000	1:8000	1:16000	1:512000				
8	152 mg		Phosphat - puffer		--		--	--	--	--				
9	152 mg		Phosphat - puffer		--		--	--	--	--				
10	152 mg		Phosphat - puffer		--		1:32000	1:2000	1: 8000	1:256000				
11	995 mg		phys. NaCl		Al(OH) ₃		1:16000	1:4000	1: 8000	1:256000				
12	995 mg		phys. NaCl		Al(OH) ₃		1:16000	1:4000	1: 8000	1:128000				
13	995 mg		phys. NaCl		Al(OH) ₃		--	1:2000	--	1: 32000				
14	995 mg		phys. NaCl		Al(OH) ₃		--	--	1: 4000	1: 32000				

Die Seren der Kaninchen Nr. 8 und 9, die ohne Adjuvans immunisiert worden waren, enthielten keine spezifischen Antikörper, während das Serum des ebenso immunisierten Kaninchens Nr. 10 einen Titer von 1 : 32000 gegenüber S 56 M hatte.

Die von den mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans immunisierten Tieren gewonnenen Antiseren waren in ihrer Qualität den mit FREUNDschem Adjuvans hergestellten Seren unterlegen. Die Antiseren Nr. 11 und 12 präzipitierten das homologe Antigen bis zu einer Verdünnung von 1 : 16000; die Antiseren Nr. 13 und 14 reagierten mit diesem Antigen überhaupt nicht.

Ausführliche Titerangaben aller hergestellten Antiseren gegenüber S 56 M, S 70 M, SM und SS sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

1.2 Überprüfung in der Immunelektrophorese

Beim Vergleich der mit den gewonnenen Antiseren und dem homologen Antigen hergestellten Immunelektrophoresepräparaten zeigte sich, daß entsprechend der Menge der in den Antiseren vorhandenen Antikörper gegen die einzelnen Muskelproteinfraktionen die Präzipitatbögen unterschiedlich stark ausgebildet waren, teilweise sogar fehlten. Qualitativ am hochwertigsten wurden deshalb die Antiseren bewertet, die mit dem homologen Antigen die meisten und kräftigsten Präzipitate bildeten.

Im vorliegenden Falle waren maximal 5 Präzipitatbögen erkennbar, die mit den Buchstaben A,C,E,F und G bezeichnet wurden und wie in Abb.1 dargestellt lokalisiert waren. Aus Tabelle 2 läßt sich die Stärke dieser einzelnen Präzipitate bei den geprüften Antiseren ablesen. Als Maß für die Intensität sind Zahlen von 1 bis 6 verwendet worden; dabei wurde mit der Zahl 6 die höchste

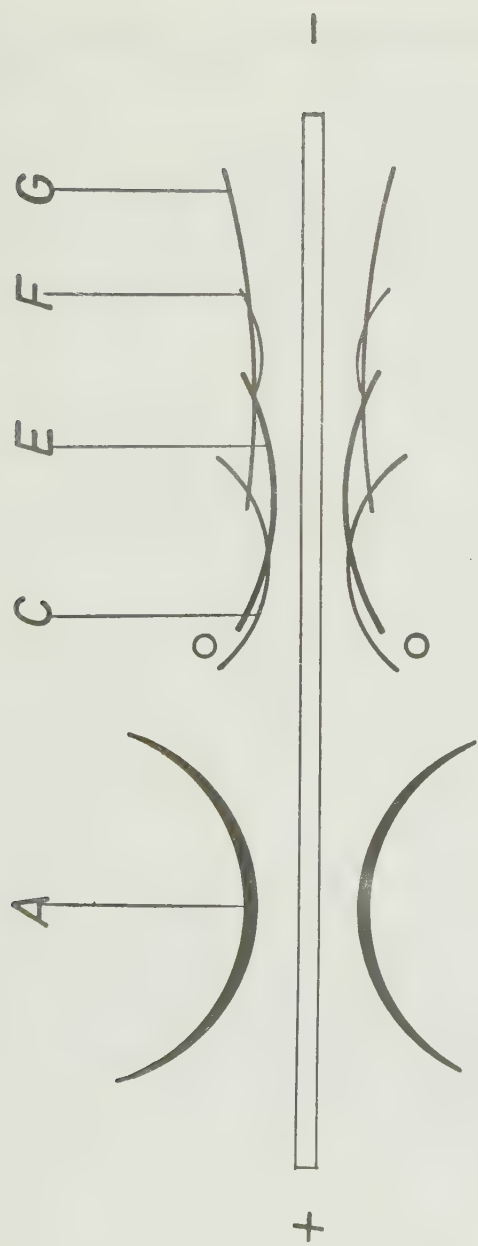


Abb. 1: Immunopherogramm eines Extrakts aus 30 Min. auf $+56^{\circ}\text{C}$ erhitzter, ungepökelter Schweinemuskulatur (S 56 M)
(schematische Darstellung)

Intensität bezeichnet, die bei den Präzipitatbanden überhaupt beobachtet werden konnte; ein nur halb so kräftig ausgebildetes Präzipitat erhielt die Zahl 3, während mit 1 ein gerade noch erkennbares Präzipitat benannt wurde. War das Präzipitat nur als verschwommener Schatten sichtbar, so wurde an Stelle der Intensitätsmaßzahl der Buchstabe S verwendet. Die Kennzeichnung der Verkürzung einer Präzipitatbande gegenüber der entsprechenden Bande auf anderen Präparaten erfolgte durch den Buchstaben v vor der Intensitätsmaßzahl.

Tabelle 2

Antiserum Nr.	Intensität der Präzipitate				
	A	C	E	F	G
1	6	3	4	2	2
2	6	3	3	3	v1
4	6	3	4	2	v2
5	6	2	-	2	2
7	6	3	-	2	2
11	5	2	3	v1	2
12	5	2	3	v1	2

Wie schon in der Röhrenpräzipitation erwiesen sich auch bei der Überprüfung in der Immunelektrophorese die Antiseren Nr. 1,2,4,5 und 7 am hochwertigsten. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Pools der Antiseren Nr. 4 und 5 (P 1) und der Antiseren Nr. 1 und 2 (P 2) sowie das ungepoolte Antiserum Nr. 7 verwendet.

2. Untersuchung der Proben eigener Herstellung

2.1 Extrakte

Eiweißgehalt

Der Eiweißgehalt der Extrakte nahm mit steigender Erhitzungstemperatur und -zeit der Proben ab. Die Extrakte der unerhitzten Kontrollproben hatten einen durchschnittlichen Eiweißgehalt von 2,5 g%, während er bei den mit kurzer Anstiegszeit auf +73°C erhitzten Proben auf durchschnittlich 0,5 g% gesunken war. Eine Ausnahme bildeten nur die Extrakte aus allen Proben des Schinkens Nr. III mit extrem hohem Salzgehalt. Bei diesen lag der Eiweißgehalt um durchschnittlich 0,2 g% höher als bei den entsprechenden Extrakten aus dem übrigen Untersuchungsmaterial.

Die Extraktion der erhitzten Proben mit phys. NaCl -Lösung, Phosphatpuffer pH 7,15 und mit 2,5 %iger NaCl -Lösung (nur bei Proben aus ungepökeltem Schweinefleisch angewandt) bewirkte keine wesentliche Änderung der Eiweißgehalte gegenüber der Aqua dest. Extraktion.

Die Extrakte aus den mit langer Anstiegszeit erhitzten Proben hatten einen um etwa 0,1 bis 0,2 g% höheren Eiweißgehalt als die entsprechenden Extrakte aus den mit kurzer Anstiegszeit erhitzten Proben.

pH - Wert

Die Extrakte der aus den Schinken Nr. I, II, III und aus ungepökeltem Schweinefleisch hergestellten Proben wiesen bei jedem der verwendeten Extraktionsverfahren pH-Werte zwischen 6,1 und 6,7 auf. Die pH-Werte der Extrakte der aus dem Schinken Nr. IV hergestellten Proben lagen zwischen 5,7 und 5,9.

Ein Anstieg des pH-Wertes mit steigender Erhitzung konnte nicht beobachtet werden.

Kochsalzgehalt:

Die Kochsalzgehalte der Extrakte nach Verwendung der verschiedenen Extraktionsflüssigkeiten sind aus der nachfolgenden Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3

Proben hergestellt aus:	NaCl - Gehalt der Extrakte nach Extraktion mit:			
	Aqua dest.	phys.NaCl-Lösung	Phosphat-puffer	2,5 %ige NaCl-Lsg.
Schinken I u.II	1,8 %	2,3 %	1,7 %	
Schinken III	3,8 %			
Schinken IV	0,9 %			
Schweinefleisch (ungepökelt)	0,06%	0,5 %	0,06%	1,4 %

2.2 Röhrchenpräzipitation

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Röhrchenpräzipitationsuntersuchungen aufgeführt. Die untersuchten Extrakte stammten aus Proben mit mittlerem Salzgehalt, die mit kurzer Anstiegszeit erhitzt wurden. Die Antiseren P 1 und P 2 präzipitierten Extrakte aus allen Proben, die 30 Minuten lang auf Temperaturen zwischen +55°C und +68°C erhitzt worden waren, bis zu einer Extraktverdünnung von 1 : 64000. Bis zur gleichen Verdünnung reagierten mit dem Antiserum Nr. 7 Extrakte von 30 Minuten lang auf +60°C

Tabelle 4

Erhitzungs- temp. -zeit (°C) (Min)		T I T E R mit dem Antiserum Nr.		
		P 1	P 2	7
unerhitzte Kontrolle		1:16 000	1:32 000	1:16 000
50	30	1:64 000	1:64 000	1:32 000
55	30	1:64 000	1:64 000	1:32 000
60	15	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	30	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	60	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	120	1:64 000	1:64 000	1:64 000
63	15	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	30	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	60	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	120	1:64 000	1:64 000	1:64 000
65	15	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	30	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	60	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	120	1:64 000	1:64 000	1:64 000
68	15	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	30	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	60	1:64 000	1:64 000	1:64 000
	120	1:32 000	1:32 000	1:32 000
70	15	1:16 000	1:16 000	1:16 000
	30	1:16 000	1:16 000	1:16 000
	60	1: 8 000	1: 8 000	1: 8 000
	120	1: 8 000	1: 8 000	1: 8 000
73	15	1: 4 000	1: 4 000	1: 4 000
	30	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	60	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	120	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
75	15	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	30	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	60	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	120	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
80	15	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000
	30	1: 1 000	1: 1 000	1: 1 000

bis $+68^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben. Extrakte aus unerhitztem Material wurden von den Antiseren P 1 und 7 genau wie Extrakte aus 15 und 30 Minuten lang auf $+70^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben bis zur Verdünnung von 1 : 16000 präzipitiert. Reagierte ein Extrakt nur in Verdünnungen bis 1 : 1000 mit den drei Antiseren positiv, so war die entsprechende Probe mindestens 30 Minuten lang auf $+73^{\circ}\text{C}$ erhitzt; sie konnte aber auch 60 Minuten lang auf $+75^{\circ}\text{C}$ erhitzt worden sein.

2.3 Immunelektrophorese

Abbildung 2 zeigt die Lokalisation der Präzipitatbögen auf einem immunelektrophoretischen Präparat, das mit einem Extrakt aus einem unerhitzten, gepökelten Schinken und dem Antiserum P 2 hergestellt wurde. Gegenüber dem in Abb. 1 dargestellten Präparat eines immunelektrophoretisch untersuchten S 56 M - Extrakts fällt anodenseitig zwischen dem Antigenbassin und dem mit dem Buchstaben A benannten Präzipitat ein weiterer, schwacher Präzipitabogen auf, der mit B bezeichnet wurde. Außerdem ist kathodenseitig unter dem Schnittpunkt der Bögen C und E ein mit dem Buchstaben D gekennzeichnetes, zusätzliches feines Präzipitat erkennbar.

Die Intensität der aufgetretenen Präzipitatbanden wird mit den gleichen Maßzahlen wie bei der immunelektrophoretischen Antiserumüberprüfung ausgedrückt.

Im folgenden werden die den einzelnen Präzipitatbögen entsprechenden Muskelproteinfraktionen mit dem gleichen Buchstaben wie diese bezeichnet. Für alle weiteren Untersuchungen in der Immunelektrophorese wurde nur noch das Antiserum P 2 verwendet.

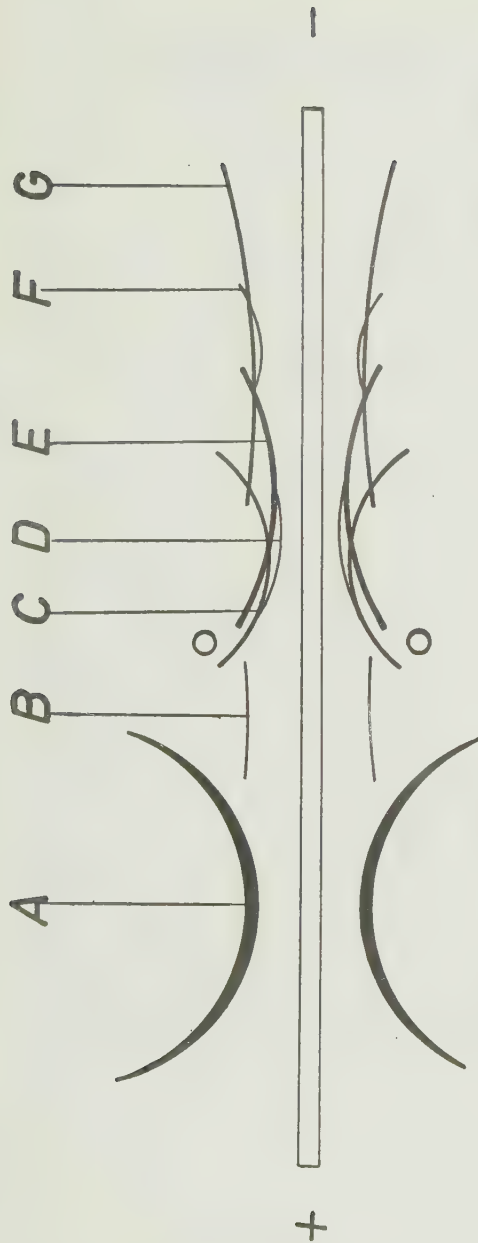


Abb.2: Immunopherogramm eines Extrakts aus unerhitztem, gepökeltem Schweineschinken
oben : Schematische Darstellung der Präzipitate und deren Bezeichnung
unten: Fotografische Aufnahme

S180



Tabelle 5

Erhitzungs- temp. -zeit (°C) (Min)		Intensität der PRÄZIPITATE nach Erhitzung der Proben mit kurzer Anstiegszeit						
		A	B	C	D	E	F	G
unerhitzte Kontrolle		6	2	3	1	4	2	4
55	15	6	2	3	1	3	2	3
	30	6	2	3	1	v3	2	3
	60	6	2	3	-	v1	-	3
	120	6	2	3	-	v1	-	3
60	15	6	1	3	-	v2	-	3
	30	6	-	2	-	-	-	v2
	60	6	-	2	-	-	-	v2
	120	6	-	2	-	-	-	v2
63	15	6	S	2	-	-	-	v2
	30	6	S	2	-	-	-	v1
	60	6	S	2	-	-	-	v1
	120	6	-	2	-	-	-	vS
65	15	6	S	2	-	-	-	v1
	30	6	-	2	-	-	-	vS
	60	6	-	2	-	-	-	-
	120	6	-	2	-	-	-	-
68	15	6	-	2	-	-	-	-
	30	6	S	2	-	-	-	-
	60	5	-	2	-	-	-	-
	120	4	-	2	-	-	-	-
70	15	4	-	2	-	-	-	-
	30	v4	-	v2	-	-	-	-
	60	v2	-	v2	-	-	-	-
	120	v2	-	v1	-	-	-	-
73	15	v4	-	v1	-	-	-	-
	30	v3	-	v1	-	-	-	-
	60	vS	-	v1	-	-	-	-
	120	-	-	v1	-	-	-	-
75	15	vS	-	vS	-	-	-	-
	30	vS	-	vS	-	-	-	-
	60	-	-	vS	-	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-
80	15	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-

2.3.1. Erhitzung mit kurzer Anstiegszeit

Aus Tabelle 5 läßt sich der Einfluß der Erhitzungstemperaturen und -zeiten ablesen. Es handelte sich hierbei zunächst um Proben aus Schinken mit mittlerem Salzgehalt, die mit kurzer Anstiegszeit erhitzt und mit Aqua dest. extrahiert worden waren. Als auffallend hitzeresistent imponierten die den Präzipitaten A und C entsprechenden Muskeleiweißfraktionen, während die Fraktionen D und F sich als besonders hitzelabil erwiesen.

Die Fraktion B zeigte bei allen Erhitzungsstufen bis $+70^{\circ}\text{C}$ kein regelmäßiges Verhalten und konnte ebenso wie die Fraktion E, die, wie an anderer Stelle noch ausgeführt wird, stark von der Pökellung abhängig war, nicht zur Beurteilung des Erhitzungsgrades herangezogen werden. War eine Probe weniger als 30 Minuten lang auf $+55^{\circ}\text{C}$ erhitzt, so konnte sie in der Immunelektrophorese nicht von unerhitztem Material unterschieden werden. Fehlten im Pherogramm die Präzipitate D und F, so hatten mindestens Temperaturen von $+55^{\circ}\text{C}$ mehr als 30 Minuten lang eingewirkt. Hatte eine Erhitzung länger als 30 Minuten bei $+65^{\circ}\text{C}$ stattgefunden, so war das mit G bezeichnete Präzipitat vollständig verschwunden. Eine Unterscheidung zwischen mehr als eine halbe Stunde auf $+60^{\circ}\text{C}$, auf $+63^{\circ}\text{C}$ und auf nicht länger als 60 Minuten lang auf $+65^{\circ}\text{C}$ erhitztem Untersuchungsmaterial war durch Intensitätsvergleiche des G- Präzipitats in gewissem Grade möglich. 120 Minuten lang auf $+65^{\circ}\text{C}$ oder 15, 30 und 60 Minuten lang auf $+68^{\circ}\text{C}$ erhitzte Proben ließen sich durch die immunelektrophoretische Untersuchung ihrer Extrakte nicht sicher unterscheiden. Nach zweistündigem Erhitzen der Proben auf $+68^{\circ}\text{C}$ oder schon nach 15 Minuten langem Erhitzen auf $+70^{\circ}\text{C}$ begann die dem Präzipitat A entsprechende Muskeleiweißfraktion zu denaturieren. Bei länger als 30 Minuten dauerndem Erhitzen auf Temperaturen von $+75^{\circ}\text{C}$ war das Präzipitat dieser Fraktion nicht

mehr erkennbar. Die Differenzierung zwischen auf $+70^{\circ}\text{C}$ und auf $+73^{\circ}\text{C}$ erhitztem Material war durch Intensitätsvergleiche möglich; doch konnte nicht zwischen 60 Minuten dauerndem Erhitzen auf $+73^{\circ}\text{C}$ und 15 Minuten langem Erhitzen auf $+75^{\circ}\text{C}$ unterschieden werden. War auf dem Pherogramm kein Präzipitat erkennbar, so war die Probe höher als $+75^{\circ}\text{C}$ erhitzt.

2.3.2. Erhitzung mit langer Anstiegszeit

Bei Erhitzung der Proben mit langer Anstiegszeit zeigten sich vor allem bei höheren Temperaturen teilweise erhebliche Unterschiede in den Pherogrammen gegenüber den mit kurzer Anstiegszeit erhitzten Proben (Tabelle 6).

Ob die Proben jedoch mit einer oder drei Stunden dauernder Anstiegszeit erhitzt waren, wirkte sich auf die Intensität der Präzipitate nicht unterschiedlich aus.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, war bei dieser Erhitzungsart das Präzipitat G erst nach 60 Minuten langem Erhitzen auf $+65^{\circ}\text{C}$ nicht mehr erkennbar. Dadurch konnten höher bzw. länger erhitzte Proben deutlich von den niedriger bzw. kürzer erhitzten Proben unterschieden werden. Im Bereich zwischen $+60^{\circ}\text{C}$ und $+65^{\circ}\text{C}$ war jedoch eine Differenzierung schwierig und nicht genau durchführbar.

Auch die Pherogramme der höher als $+65^{\circ}\text{C}$ und niedriger als $+70^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben glichen sich. Bei 30 Minuten langem Erhitzen auf $+70^{\circ}\text{C}$ begann die Denaturierung der Fraktion A, die erst bei länger als 120 Minuten dauernder Erhitzung auf $+75^{\circ}\text{C}$ abgeschlossen war. In diesem Bereich war durch Intensitätsvergleiche der Präzipitate eine Unterscheidung zwischen den erreichten Temperaturen und Erhitzungszeiten möglich.

Tabelle 6

Erhitzungs- temp. -zeit (°C) (Min)		Intensität der Präzipitate nach Erhitzung der Proben mit langer Anstiegszeit		
		A	C	G
60	15	6	3	3
	30	6	2	v2
	60	6	2	v2
	120	6	2	v2
63	15	6	2	v2
	30	6	2	v2
	60	6	2	v1
	120	6	2	v1
65	15	6	2	v2
	30	6	2	v1
	60	6	2	v1
	120	6	2	-
68	15	6	2	-
	30	6	2	-
	60	6	2	-
	120	6	2	-
70	15	6	2	-
	30	v6	v2	-
	60	v6	v2	-
	120	v5	v2	-
73	15	v5	v2	-
	30	v5	v1	-
	60	v4	v1	-
	120	v3	vS	-
75	15	v3	vS	-
	30	v2	vS	-
	60	v1	vS	-
	120	vS	vS	-

Erhitzungs-
temperatur:

S397

63°C

S401

65°C

S405

68°C

S409

70°C

S413

73°C

S417

75°C

Abb. 3: Immunelektropherogramme der 30 Minuten mit
langer Anstiegszeit erhitzten Modellproben

Tabelle 7

Versuchs- nummer		Versuchs- anordnung	Schweine- fleisch ungepökelt	Schweineschinken, gepökelt, mit hohem (6,9 %) mittlerem (2,4 %) niedrigem (1,6 %) NaCl - Gehalt		Schweine- fleisch ungepökelt	Schweineschinken, gepökelt, mit hohem (6,9 %) mittlerem (2,4 %) niedrigem (1,6 %) NaCl - Gehalt	
				Kurze Anstiegszeit	Lange Anstiegszeit		Lange Anstiegszeit	Kurze Anstiegszeit
60	A C E G	6	6	6	6	6	6	
		2	2	2	2	2	2	
		3	-	-	3	-	-	
		v2	v2	v2	v2	v2	v2	
63	A C E G	6	6	6	6	6	6	
		2	2	2	2	2	2	
		3	-	-	3	-	-	
		-	v1	v1	-	v2	v2	
65	A C E G	6	6	6	6	6	6	
		2	2	2	2	2	2	
		3	-	-	3	-	-	
		-	vS	vS	-	v1	v1	
68	A C E G	v5	6	6	6	6	6	
		2	2	2	2	2	2	
		3	-	-	3	-	-	
		-	-	-	-	-	-	
70	A C E G	S	v6	v4	v4	v6	v6	
		v2	v2	v2	v2	v2	v2	
		v2	-	-	v1	-	-	
		-	-	-	-	-	-	
73	A C E G	vS	v4	v3	v2	v5	v5	
		v1	v1	v1	vS	v1	v1	
		-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	-	

2.3.3. Einfluß der Pökellung

Beim Vergleich der immunoelektrophoretischen Präparate von Extrakten aus erhitztem, ungepökelttem Schweinefleisch und gepökelttem Untersuchungsmaterial mit hohem, mittlerem und niedrigem Kochsalzgehalt zeigten sich Unterschiede (Tabelle 7). 30 Minuten dauernde Erhitzung auf $+63^{\circ}\text{C}$ führte in den Proben aus ungepökelttem Schweinefleisch zum Verschwinden der G - Fraktion. Auf den Pherogrammen der 30 Minuten auf $+65^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben aus gepökelttem Untersuchungsmaterial konnte sie dagegen noch deutlich wahrgenommen werden. Bei höherer Erhitzung als $+68^{\circ}\text{C}$ mit kurzer Anstiegszeit und $+70^{\circ}\text{C}$ mit langer Anstiegszeit war das Präzipitat A in den Proben aus ungepökelttem Schweinefleisch stets wesentlich schwächer sichtbar als in den gleichartig erhitzten Proben aus gepökelttem Material.

Wurden die Proben mit kurzer Anstiegszeit erhitzt, so konnten vor allem bei Erhitzung über $+70^{\circ}\text{C}$ auch Unterschiede bei gepökelttem Material in Abhängigkeit vom Salzgehalt festgestellt werden. Hier kam es in den Proben mit hohem Salzgehalt zu einer geringgradig schwächeren Denaturierung -vor allem der A-Fraktion- als in den Proben mit mittlerem und niedrigem Salzgehalt. Bei Erhitzung mit langer Anstiegszeit war dagegen die Intensität der Präzipitate bei gepökelttem Untersuchungsmaterial mit unterschiedlichen Salzgehalten gleich.

Wie aus den Tabellen 7 und 8 zu ersehen ist, war das Präzipitat E bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung von gepökelttem Untersuchungsmaterial bereits nach Erhitzung auf $+63^{\circ}\text{C}$ vollständig verschwunden, während es auf den Pherogrammen der ungepökelten Schweinefleischproben zum Teil noch nach Erhitzung auf $+73^{\circ}\text{C}$ erkennbar war. Die Extrakte aus ungepökelttem Untersuchungsmaterial hatten bei niedrigen Erhitzungstemperaturen eine kräftig rote und selbst bei Erhitzung auf $+73^{\circ}\text{C}$ noch eine blaßrote

Tabelle 8

Anzahl Proben	Anzahl Proben	S c h w e i n e f l e i s c h, ungepökelt				Schweineschinken, gepökelt			
		extrahiert mit		2,5 %ige		extrahiert mit		mit	
Phosphat- puffer	Aqua dest.	phys.NaCl- Lösung	phys.NaCl- Lösung	NaCl-Lsg.	Phosphat- puffer	Aqua dest.	phys.NaCl- Lösung	Phosphat- puffer	phys.NaCl- Lösung
63 A C E G	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -
65 A C E G	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -	6 2 3 -
68 A C E G	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -	v5 2 3 -
70 A C E G	v1 v2 v3 -	S v2 v2 -	v2 v2 v3 -	v2 v2 v2 -	v4 v2 - -	v4 v2 - -	v4 v2 - -	v4 v2 - -	v4 v2 - -
73 A C E G	- v1 v1 -	v5 v1 - -	v5 S S -	v5 v1 - -	v5 v2 - -	v5 v2 - -	v5 v2 - -	v5 v2 - -	v5 v2 - -

Farbe. Dagegen waren die Extrakte aus höher als $+63^{\circ}\text{C}$ erhitztem, gepökeltem Material stets bernsteinfarben.

Von den zur Untersuchung des Nitriteinflusses hergerichteten Proben war der Extrakt der Probe mit Nitrit und Ascorbinsäurezusatz bernsteinfarben; der Extrakt der Probe ohne diese Zusätze hatte dagegen eine dunkelrote Farbe. In den entsprechenden Immunopherogrammen fehlte der Präzipitatbogen E nur auf dem mit dem Extrakt aus der Probe mit Nitrit und Ascorbinsäurezusatz hergestellten Präparat. Im Pherogramm der Probe ohne Nitritzusatz war dieses Präzipitat kräftig ausgebildet.

2.3.4. Einfluß des Extraktionsmittels

Der Einfluß verschiedener Extraktionsmittel auf die Intensität der Präzipitate ist aus Tabelle 8 ersichtlich. Danach war sowohl bei ungepökeltem Schweinefleisch als auch bei den Schinkenproben mit mittlerem Salzgehalt die Phosphatpufferextraktion am wenigsten geeignet. Mit phys. NaCl-Lösung ließ sich aus dem gepökelten Schinken mit mittlerem Salzgehalt kaum mehr reaktionsfähiges Material extrahieren als mit Aqua dest. Bei ungepökeltem Schweinefleisch aber vor allem nach Erhitzung über $+70^{\circ}\text{C}$ führte die NaCl - Extraktion zu günstigeren Ergebnissen.

2.3.5. Einfluß der Austrocknung des Untersuchungsmaterials

Die im Exsiccator getrockneten Hälften der erhitzten Schinkenscheiben hatten nach der Trocknung eine harte Konsistenz angenommen und etwa die Hälfte ihres Gewichts verloren, so daß der Wassergehalt von 76,5 % auf 26,5 % gesunken war. Die Extrakte aus den getrockneten und ungetrockneten Hälften der Schinkenscheiben waren jedoch immunoelektrophoretisch nicht zu unterscheiden.

3. Untersuchung der Proben des Handels

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Untersuchung von 100 gepökelt und gekochten Schweinefleischherzeugnissen aufgestellt.

Die Kochsalzgehalte der Extrakte lagen zwischen 0,6 und 3,2 %, die pH-Werte schwankten zwischen 5,42 und 6,63, und die Eiweißgehalte betrugen zwischen 0,25 und 1,23 g%.

Der Nachweis der Erhitzung dieser Proben erfolgte durch den Vergleich ihrer Pherogramme mit den Pherogrammen der mit langer Anstiegszeit erhitzten Modellproben eigener Herstellung. Bei den Proben, bei denen in Tabelle 9 mehrere Erhitzungstemperaturen oder -zeiten angekreuzt sind, lag die Erhitzung entweder zwischen diesen Stufen oder aber die Pherogramme der Modellproben glichen sich bereits so, daß eine Unterscheidung nicht möglich war.

Zwei Proben (Nr. 16 und 20) waren höchstens 30 Minuten lang auf +65°C erhitzt, es konnten aber auch nur Temperaturen von +60°C oder +63°C eingewirkt haben. 22 Proben waren länger als 30 Minuten lang auf +65°C und weniger als 30 Minuten lang auf +70°C erhitzt, während 76 Proben länger oder höher als 15 Minuten lang auf +70°C erhitzt waren. Auf den Pherogrammen von 24 Proben war kein Präzipitat erkennbar; das bedeutet, daß hier Temperaturen über +75°C eingewirkt hatten.

Tabelle 9

Nr.	D e k l a r a t i o n	Länge u. Breite der Scheiben (cm)	NaCl - Gehalt (%)	Biuret- Eiweiß- gehalt (g%)	Ermittelte Erhitzungstemperaturen und -zeiten			
					60°C 30-120 Min.	63°C 60-120 Min.	65°C 120 Min.	65°C 120 Min.
					63°C 15- 30 Min.	65°C 60 Min.	68°C 15-120 Min.	70°C 15 Min.
1	gek.Vorderschinken, vp.	11x11	1,5	0,81				+
2	gek.Vorderschinken	14 ø	1,8	0,77				+
3	gek.Vorderschinken	14x18	2,1	0,79				+
4	Prager Schinken	17x11	0,6	0,43				+
5	Prager Schinken	19x13	1,1	0,48				+
6	Prager Schinken	19x13	1,4	0,83				+
7	Saftschinken	14 ø	1,5	0,62				+
8	Rollsaftschinken	17 ø	1,1	0,74				+
9	Rollsaftschinken	15 ø	1,1	0,83				+
10	Hintersaftschinken	12x12	3,1	0,81				+
11	gekochter Schinken	15x12	1,1	0,65				+
12	gekochter Schinken	15 ø	1,3	0,63				+
13	gekochter Schinken	19x14	1,0	1,16				+
14	gekochter Schinken	19x12	0,9	0,48				+
15	gekochter Schinken	18x15	1,2	0,38				+
16	gekochter Schinken	16x9	0,9	0,34				+
17	gekochter Schinken	19x12	1,1	0,41				+
18	gekochter Schinken	18x15	0,8	0,45				+
19	gekochter Schinken	15x13	1,2	0,53				+
20	Kaiserfleisch, vp.	10 ø	1,3	0,85				+
21	gek. Kassler	13x9	1,2	0,38				+
22	Landrauchschinken, gek.	12 ø	1,6	0,69				+
23	Ardenner Spez.Schinken	21x16	1,4	0,79				+
24	Schwarzwälder, gekocht	11 ø	1,3	1,23				+

IV. Diskussion

Die Schaffung einer Kontrollmethode zum Nachweis der Erhitzung von Kochschinken ist aus technologischen und hygienischen Gründen notwendig. Sie dient sowohl der Überprüfung der eigenen Produktion als auch der Lebensmittelüberwachung und ist gerade in einer Zeit des verstärkten internationalen Warenverkehrs zur Kontrolle von Importwaren erforderlich.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Kombination der von SCHNEIDER u. SZÖRÉNYI (1958) und der von COHEN (1966) vorgeschlagenen Methoden zum Erhitzungsnachweis ein Verfahren zu entwickeln, das eine möglichst detaillierte Aussage über das Temperatur-Zeit-Geschehen, dem das betreffende Produkt unterlegen hat, ermöglicht. Die Immunelektrophorese bietet sich hierfür besonders an, weil sie die verschiedenen Fraktionen eines Gemisches unterschiedlich hitzeempfindlicher Muskeleiweiße aufzutrennen gestattet. Damit vermittelt die Immunelektrophorese eine wertvollere Information als die nur eine Alternativaussage ermöglichende Röhrenpräzipitation.

Immerhin mußte auch die Röhrenpräzipitation wegen der besonders einfachen Handhabung auf ihre Brauchbarkeit überprüft werden. Mit diesem Verfahren war eine Unterscheidung zwischen auf $+55^{\circ}\text{C}$ und $+68^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben nicht möglich. Der Grund dafür zeigt sich beim Vergleich der Tabellen 4 und 5. Ein steiler Titerabfall in der Röhrenpräzipitation tritt erst ein, wenn die Schädigung der in der Immunelektrophorese als "A" bezeichneten Fraktion beginnt. Diese Fraktion muß demnach den Hauptanteil der präzipitablen Substanz bilden. Sie besteht im wesentlichen aus Eiweißen, die dem Serumalbumin zumindest in serologischer Beziehung sehr ähnlich sind (BARTEN 1965, SINELL 1966, 1968).

Wenn der Extrakt von den hier verwendeten Antiseren nur bis zu Verdünnungen von 1 : 1000 präzipitiert wurde, ließ sich allenfalls aussagen, daß Temperaturen von mindestens +73°C eingewirkt hatten. Mit dem gleichen Titer wurden auch noch auf +80°C erhitzte Proben präzipitiert. Mittels Immunelektrophorese waren in diesen Extrakten keine Präzipitate mehr erkennbar. Dies stimmt mit den Angaben von CROWLE (1958) überein, der die geringere Empfindlichkeit bei Antigen - Antikörper - Reaktionen im Agar.- Gel mit mechanischen Widerständen bei der Diffusion begründete. Extrakte aus gepökeltem, erhitztem Untersuchungsmaterial wurden in der Röhrchenpräzipitation mit einem höheren Titer präzipitiert als Extrakte aus ungepökeltem Schweinefleisch. Die Ursache dafür kann nur darin liegen, daß bei Salzgegenwart der Grad der Hitzedenaturierung geringer ist, was auch WEBER (1934), KÖRMENDY u. GANTNER (1960,1967) und SHERMAN (1961) berichtet haben. Offensichtlich geht dieses Phänomen mit einem geringeren Verlust an serologischer Aktivität einher.

Die Röhrchenpräzipitation ist für den Nachweis einer ausreichenden Erhitzung speziell in Kochschinken nicht sehr geeignet, da sie im fraglichen Temperaturbereich um +65°C keine Differenzierung zuläßt. Möglicherweise kommt dieser Methode eine gewisse Bedeutung bei der Untersuchung solcher Erzeugnisse zu, die auf höhere Temperaturen erhitzt werden. Die Klärung dieser Frage lag jedoch außerhalb des hier gestellten Themas.

Dadurch, daß in der Immunelektrophorese Anzahl, Lage und Intensität mehrerer Präzipitate zur Beurteilung des Erhitzungsgrades herangezogen werden konnten, erwies sich diese Methode als besonders vorteilhaft. Die immunelektrophoretischen Bilder erlaubten in den meisten Fällen eine Zuordnung zu einer definierten Temperatur - Zeit - Funktion, so daß Temperatursprünge um 5°C und teilweise sogar kleinere Sprünge und verschiedene Erhitzungszeiten einwand-

frei erfaßt werden konnten. Die Pherogramme aller gleichartig erhitzten Proben glichen sich bei häufiger Wiederholung der Experimente auch mit unterschiedlichem Schinkenmaterial, so daß sich das Verfahren als gut reproduzierbar erwies.

In Übereinstimmung mit COHEN (1966) konnte ein Einfluß der Anstiegszeit auf die Geschwindigkeit der Hitzedenaturierung festgestellt werden. Eine kurze Anstiegszeit führte stets zu einer rascheren und intensiveren Denaturierung als eine lange Anstiegszeit. Derartige Unterschiede in der Denaturierungsgeschwindigkeit bei gleichbleibender Einwirkungsdauer der Maximaltemperatur machten sich nur dann bemerkbar, wenn die Anstiegszeit weniger als 60 Minuten betrug; bei längeren Anstiegszeiten als 60 Minuten war ein Einfluß auf die Denaturierungsgeschwindigkeit nicht mehr nachweisbar. Nun wird man auf Grund der Größe der Kochschinken stets mit längeren Anstiegszeiten als 60 Minuten zu rechnen haben; nach GISSKE (1962) läßt sich für den kleinsten, als Halbkonzerve im Handel befindlichen Dosenschinken eine Anstiegszeit von 230 Minuten errechnen. Daher ist es gerechtfertigt, die Pherogramme der mit langer Anstiegszeit erhitzten Modellproben als Vergleichsstandard den Pherogrammen von erhitztem Material unbekannter Herkunft gegenüberzustellen.

Ebenso wie bei der Röhrchenpräzipitation zeigten sich in der Immunelektrophorese bei Temperaturen über $+68^{\circ}\text{C}$ trotz gleichartiger Erhitzung Unterschiede zwischen ungepökelt und gepökelt Material. Da diese Unterschiede, wie festgestellt wurde, nicht durch den Kochsalzgehalt des Extraktionsmittels bedingt waren, ergibt sich, wie auch KÖRMENDY u. GANTNER (1960, 1967) und SHERMAN (1961) beobachtet haben, daß der Eintritt der Hitzedenaturierung nur dann verzögert wird, wenn die Salze schon bei der Erhitzung anwesend sind.

Bei Erhitzung mit langer Anstiegszeit waren bei gepökeltem Material keine Abhängigkeiten mehr vom Salzgehalt zu bemerken, so daß beim immunoelektrophoretischen Nachweis der Grad der Pökellung unberücksichtigt bleiben konnte. Bei der Pökellung wird dem Fleisch u.a. auch Nitrit zugesetzt, was die bekannten Veränderungen am Myoglobin hervorruft. Die rote Farbe der Extrakte aus ungepökeltem Untersuchungsmaterial wies darauf hin, daß Myoglobin in der Lösung vorhanden war. Diese Extrakte wiesen stets eine kräftig ausgebildete Präzipitatbande "E" auf. Dagegen fehlte diese Bande in den Pherogrammen des gepökelten Materials und zwar unabhängig von der Anwesenheit von Kochsalz. Somit liegt die Vermutung nahe, daß die mit "E" bezeichnete Fraktion mit der Myoglobinfraktion identisch ist.

Zusammenfassend läßt sich zum immunoelektrophoretischen Erhitzungsnachweis feststellen, daß weder die Salzkonzentration noch die Austrocknung des Untersuchungsmaterials oder die Dauer der Anstiegszeit, sofern diese mindestens 60 Minuten betragen hat, die Ergebnisse beeinflussen.

Die Aussagekraft der Methode ist jedoch von der Qualität des Antiserums abhängig. Im Handel erhältliche Anti-Serum-Seren enthalten nach BARTEN (1965) und SINELL (1966, 1968) nur Antikörper gegen die in dieser Arbeit mit "A" bezeichnete Fraktion. Das bei den vorliegenden Versuchen verwendete Antiserum mußte aber auch gegen die für eine Abschätzung des Erhitzungsgrades relevanten Fraktionen "C" und "G" Antikörper in ausreichender Menge enthalten; ein Anti-Serum - Serum war daher unbrauchbar, so daß ein Anti - Schweinemuskulatur - Serum hergestellt werden mußte.

Bei der Immunisierung erwies es sich als zweckmäßig, Freund-sches Adjuvans (vgl. FINGER 1961, 1964) zu verwenden, das sich dem $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adjuvans als überlegen erwies. Seren aus mehreren Immunisierungen können ohne weiteres gepoolt werden. Die Anwendung für Kontrollzwecke im Routinebetrieb

würde allerdings zur Voraussetzung haben, daß ein solcher Antiserum -Pool standardisiert wird. Außerdem wird es zur genauen Bestimmung des Erhitzungsgrades von unbekanntem Material unumgänglich sein, Modellproben herzustellen und mit dem eigenen Antiserum für jede Temperatur - Zeit - Kombination Vergleichsstandards anzufertigen.

Bei den Proben eigener Herstellung konnte mit steigender Erhitzung ein Abfall der Extrakteiweißgehalte festgestellt werden, was mit den Beobachtungen COHENs (1966) und GRAUS (1969) übereinstimmt. Dagegen standen bei den Proben des Handels die Extrakteiweißgehalte in keiner Relation zu den Temperatur - Zeit - Kombinationen, die den entsprechenden Pherogrammen entnommen werden konnten. Dies kann an der Heterogenität des Ausgangsmaterials wie z.B. unterschiedlichen Wasser-, Fett- und Bindegewebsgehalten liegen, müßte im einzelnen aber noch weiter untersucht werden.

Die Bestimmung des Eiweißgehalts von Extrakten aus unbekannt erhitztem Material ist damit zur groben Abschätzung des Erhitzungsgrades nicht ohne weiteres geeignet.

In Tabelle 9 sind die untersuchten Fleischerzeugnisse nach Sorten zusammengestellt. Ein Zusammenhang zwischen der Warengattung und Erhitzungstemperatur ist nicht ersichtlich. Andererseits ließ sich in vorverpackten Erzeugnissen und Dosenschinken (im Handel als Saftschinken bezeichnet KOCH (1966)) dieselbe Erhitzung nachweisen wie in loser verkaufter Ware.

Die ermittelten Kerntemperaturen von Schinken mit besonders großen Abmessungen unterschieden sich nicht signifikant von denen mit kleinen Abmessungen. Damit wird bestätigt, daß die Erhitzungsdauer in der Praxis stets nach der Größe der Schinken bemessen wird.

Bei zwei von 100 Proben erschien eine ausreichende Erhitzung nach GISSKE (1962) fraglich.

Mit den Ergebnissen aus diesem Untersuchungsmaterial scheint erwiesen zu sein, daß die vorgeschlagene Methode auch an Material unterschiedlicher Herkunft praktiziert werden kann. Da das Verfahren ohne allzu großen Aufwand darstellbar ist, sollte seine Anwendbarkeit auch im praktischen Untersuchungsbetrieb zur Diskussion gestellt werden.

V. Zusammenfassung

Durch die Hitzedenaturierung verlieren die Proteine des Sarkoplasmas u.a. ihre Löslichkeit und ihre serologische Aktivität. Diese Tatsache war die Voraussetzung für die Versuche zum Erhitzungsnachweis von Kochschinken mittels serologischer Methoden.

Kaninchen wurden mit Extrakten von auf $+55^{\circ}\text{C}$ erhitztem Schweinefleisch immunisiert. Die besten Antiseren konnten bei gleichzeitiger Verwendung von Freundschem Adjuvans gewonnen werden.

Als Modell für die verschiedenen Erhitzungsstufen wurden rohe, gepökelte Schinkenproben mit verschiedenen Kochsalzgehalten sowie ungepökelte Schweinefleischproben mit unterschiedlicher Anstiegszeit auf Temperaturen zwischen $+55^{\circ}\text{C}$ und $+80^{\circ}\text{C}$ für jeweils 15, 30, 60 und 120 Minuten erhitzt und anschließend nach verschiedenen Verfahren extrahiert. Die Extrakte wurden nach der Röhrchenpräzipitationsmethode und in der Immunelektrophorese mit den selbst hergestellten Antiseren untersucht.

In der Röhrchenpräzipitation war an Hand des Titors keine Unterscheidung zwischen auf $+55^{\circ}\text{C}$ und $+68^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben möglich.

In der Immunelektrophorese konnten dagegen durch Anzahl, Lage und Intensität der Präzipitate die verschieden erhitzten Modellproben gegeneinander abgegrenzt werden. Die immunelektrophoretischen Bilder erlaubten in den meisten Fällen eine Unterscheidung von Temperatursprüngen um 5°C und teilweise sogar kleinere Sprünge und von verschiedenen Erhitzungszeiten. Die erhaltenen Modellpherogramme wurden zum Vergleich mit den Pherogrammen der Proben des Handels verwendet und waren gut reproduzierbar.

Von 100 gepökelten und gekochten Schweinefleischerzeugnis-

sen aus dem Handel war nur bei zwei Proben eine ausreichende Erhitzung fraglich; 98 Proben erwiesen sich als ausreichend erhitzt.

VI. Literaturverzeichnis

1. Baranowski. T. Die Isolierung von kristallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskeln
(1939) Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 260, 43
2. Barten, U. Immunologische Untersuchungen an einigen wasserlöslichen Muskeleiweißen
(1965) Vet. med. Diss. F.U. Berlin
3. Bate-Smith, E.C. Native and denatured muscle proteins
(1938) Proc. Roy. Soc. 124 B, 136
4. Behrens, M. Über eine Verbesserung der Gefrier-trocknung von Organen
(1952) Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 291, 245
5. Beisenherz, G., Diphosphofructose-Aldolase, Phos-
H.J. Boltze, phoglyceraldehyd-Dehydrogenase,
Th. Bücher, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-
R. Czok, phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-
K.H. Garbade, Kinase aus Kaninchen-Muskulatur
E. Meyer-Arendt in einem Arbeitsgang
u. G. Pfeleiderer Z. Naturforsch. 8b, 555
(1953)
6. Bosch, M.W. Bijdrage tot de karakterisering van
(1951) spieren door electrophorese
Scheltema & Holkema's Boekhandel,
Amsterdam

7. Cohen, E.H.
(1966) Protein changes related to ham processing temperatures
I. Effect of time-temperature on amount and composition of soluble proteins
J. Food Sci. 31, 746
8. Coretti, K.
(1957) Eine Schnellmethode zum Nachweis der ausreichenden Erhitzung in Dosenschinken
Fleischwirtsch. 9, 113
9. Crowle, A.
(1958) A simplified micro double-diffusion agar precipitin technique
J. Laborat. Clin. Med. 52, 784
10. Dean, H.R. u.
R.A. Webb
(1926) The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction
J. Path. Bact. 29, 473
11. Degenkolb, E. u.
M. Hingerle
(1967) Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleisch-erzeugnissen
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 241
12. Dwornikowa, P.D.
(1953) Isolierung von kristallisiertem Myogen A und B aus Schweinemuskeln und Ausarbeitung einer Methode ihrer getrennten Kristallisation
Ukrain.Biochem. J. 25, 157
ref. in:Chem.Zbl. 125, 1978 (1954)

13. Eyermann, K.
(1955) Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelten Fleisches
Vet. med. Diss., München
14. Finger, H.
(1961) Versuch einer Darstellung der Wirkungsweise des Freundschens Adjuvans
Z. Immunit. Forsch. 122, 15
15. Finger, H.
(1964) Das Freundschsche Adjuvans: Wesen und Bedeutung
Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut, dem Georg Speyer Haus und dem Ferdinand Blum Institut zu Frankfurt/Main Heft 60
G. Fischer Verl., Stuttgart
16. Flaschenträger, B.
u. E. Lehnartz
(1951) Physiologische Chemie
Band 1
Verl. Springer, Berlin
17. Fornet, W. u.
M. Müller
(1910) Praktische und theoretische Präzipitinuntersuchungen
Z. f. Hyg. 66, 215
18. Fujimaki, M. u.
F.E. Deatherage
(1964) Chromatographic fractionation of sarcoplasmic proteins of beef sceletal muscle on ion exchange cellulose
J. Food. Sci. 29, 316

19. Gantner, G. u.
L. Körmendy
(1968)
Verfahren zur Bestimmung der ausreichenden Erhitzung von Fleisch-
erzeugnissen mit dem Phosphatase-
Test
Fleischwirtsch. 48, 188
20. Giles, B.C.
(1962)
Species differences observed in
the sarcoplasmic proteins of
mammalian muscle
J. Sci. Food Agric. 13, 264
21. Giles, B.C.
(1965)
Studies on beef sarcoplasmic
proteins
XIth European Meeting of Meat
Research Workers
22. Gißke, W.
(1960)
Zum Problem des Geleeabsatzes bei
Dosenschinken
Jahresbericht 1960 der Bundesanstalt
f. Fleischforschung, Kulmbach
23. Gißke, W.
(1962)
Die Eignung der Luftkochung zur
Herstellung von Dosenschinken
Fleischwirtsch. 14, 297
24. Grau, R.
(1969)
Fleisch und Fleischwaren, 2. Aufl.
Verl. P. Parey, Berlin, Hamburg
25. Hamm, R.
(1952)
Die Erforschung der Fleischprote-
ine und ihre lebensmittelchemische
Bedeutung
Fleischwirtsch. 4, 35

26. Hamm, R. Einfluß des Erhitzens auf
 (1965) tierisches Gewebe
 Dechema Monographien 56, 159
27. Hamm, R Heating of muscle systems
 (1966) In: The Physiology and Biochemistry
 of Muscle as Food. Hrsg. von
 Briskey, Cassens u. Trautmann
 The University of Wisconsin Press
 Madison, Milwaukee u. London
28. Hamm, R u. Changes in hydration, solubility
 F.E. Deatherage and charges of muscle proteins
 (1960) during heating of meat
 Food Research 25, 587
29. Hashimoto, Y. Researches on the detection of
 u. T. Yasui meat by serological tests
 (1957) J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.
 50, 171
30. Haurowitz, F. Eiweißdenaturierung
 (1960a) Antigene, Antikörper und Komplement
 (1960b) In: Handbuch der physiologisch-
 und pathologisch-chemischen Analyse
 Hrsg.v. Hoppe-Seyler/Thierfelder
 10. Aufl. 4.Bd. 1. Teil
 Springer Verl. Berlin, Göttingen
 Heidelberg

31. Iwanow, I.I.,
W.W. Kadykow
u.W.A. Jurjew
(1959) Über die Existenz von Globulin X
in Form eines individuellen Proteins
Bull. Exp. Biol. Med. 48, 46
ref.in: Chem.Zbl. 131, 1561 (1960)
32. Jacob, J.J. C.
(1947) The electrophoretic analysis of
protein extracts from striated
rabbit muscle
Biochem. J. 41, 83
33. Jaenicke, R.
(1965) Wärmeaggregation und Wärmedenatu-
rierung von Proteinen
Dechema Monographien 56, 207
34. Kauzmann, W.
(1956) Structural factors in the protein
denaturation
J. Cell. Comp. Physiol. 47, 113
35. Kesztyüs, L u.
V. Várterész
(1945) Die Antigeneigenschaften des
Myoglobins
Z. Immunit. Forsch. 105, 372
36. Koch, H.
(1966) Die Fabrikation feiner Fleisch-
und Wurstwaren, 15.Aufl.
Verl. Sponholz, Frankfurt /M
37. Körmendy, L. u.
G. Gantner
(1960) Über die saure Phosphatase des
Fleisches
Z. Lebensmittel-Untersuch. u.
Forsch. 113, 13

38. Körmendy, L. u.
G. Gantner
(1967) Neuere Angaben über die saure
Phosphatase des Fleisches
Z. Lebensmittel-Untersuch. u.
Forsch. 134, 141
39. Kotter, L.,
Chr. Herrmann,
C. Ring u.
G. Corsico
(1966) Untersuchungen zur Steigerung der
Antikörperbildung gegen erhitztes
Eiweiß mittels Metallverbindungen
Zbl. Vet. Med. 13, 613
40. Kronman, M.J.,
L.E. Weinberger u.
R.J. Winterbottom
(1960) The water-soluble proteins of
bovine skeletal muscle
Arch. Biochem. Biophys. 86, 238
41. Lee, F.A. u.
R. Grau
(1966) Verhalten vom Sarkoplasma beim
Erhitzen
XIIth European Meeting of Meat
Research Workers, Sandefjord
42. Liebermann v., L.
u. J. Freund
(1923) War Fleisch oder Wurst bis zur
Tötungstemperatur von Parasiten
erhitzt ?
Z. f. Hyg. 97, 315
43. Lienhop, E.
(1967) Handbuch der Fleischwarenherstel-
lung 7.Aufl.
Verl. G. Hempel, Braunschweig
44. Lind, J.
(1965) The determination of the acid
phosphatase activity in canned
hams
Dåseskinker-Undersøgelse Forsøg
25/65 A, Annex F, Danish Meat Pro-
ducts Laboratory, Kopenhagen

45. Mathies, P.
(1966) Entwicklung eines quantitativen
und qualitativen Esterasenachwei-
ses mit Indoxylacetat ausgearbei-
tet an Milch mit einem Anhang für
Fleisch
Vet. med. Diss., München
46. Meyer, K. u.
H. Weber
(1933) Das kolloidale Verhalten der
Muskeleiweißkörper
Biochem. Z. 266, 137
47. Nasr, S.,
A. Purr u.
L. Kotter
(1962) Papierstreifentests auf vorausge-
gangene Temperatureinflüsse für
Lebensmittel tierischer Herkunft
Tierärztl. Umschau 17, 345
48. Obermeyer, F. u.
E.P. Pick
(1903) Über den Einfluß physikalischer
und chemischer Zustandsänderungen
präzipitinogener Substanzen auf
die Bildung von Immunpräzipitinen
Wien. klin. Wschr. 24, 660
49. Obermeyer, F. u.
E.P. Pick
(1906) Über die chemischen Grundlagen
der Arteigenschaften der Antikörper
Wien. klin. Wschr. 27, 327
50. Pauling, L.
(1958) Chemie, eine Einführung
Verl. Chemie, Weinheim/Bergstr.
51. Pfeiffer, G.,
L. Kotter,
D. Böhm u.
P. Glatzel
(1969) Zum Nachweis der vorausgegangenen
Hitzeeinwirkung auf Fleisch und
Fleischerzeugnisse mittels eines
neuentwickelten Carbesterasetests
Fleischwirtsch. 49, 209

52. Rapoport, S.M. Medizinische Biochemie, 4.Aufl.
 (1966) Verl. Volk u. Gesundheit, Berlin
53. Reuter, H. Herstellung von Kochschinken
 (1957) Fleischwirtsch. 9, 204
54. Rosenberg, R. Versuche zur Artdifferenzierung
 (1926) von gekochtem Eiweiß mittels
 Präzipitinreaktion
 Zbl. Bakt. I. Orig. 98, 259
55. Rosenberg, R. Eine Methode der präzipitatori-
 (1928) schen Eiweißdifferenzierung
 Zbl. Bakt. I. Orig. 107, 448
56. Rust, F.W. Über die Bedeutung der Katalase-
 (1949) probe für die Beurteilung der
 Fleischkonserven, insbesondere
 Freibankkonserven
 Vet. med. Diss., Hannover
57. Scheidegger, J.J. Une micro-méthode de l'immuno-
 (1955) électrophorèse
 Intern. Arch. Allergy 7, 103
58. Schmidt, W.A. Studien über Präzipitinreaktion
 (1908) und erhitzte Eiweißstoffe
 Biochem. Z. 14, 294
59. Schneider, L. u. A főzés hatása a hús és töltelékáru
 F. Szörényi fehérjéinek koagulálására
 (1958) Magyar Allatorvosok Lapja 13 évt
 6 sz, 156

60. Schnier, L.
(1962) Herstellung von Kochschinken
Fleischwirtsch. 14, 1005
61. Schönberg, F.
(1947) Zum Wert der Katalaseprobe für
die Feststellung ausreichender
Erhitzung bedingt tauglichen Flei-
sches und für die Prüfung von
Fleischkonserven, insbesondere
Freibankkonserven
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 54, 197
62. Scopes, R.K.
(1964) The influence of post-mortem con-
ditions on the solubilities of
muscle proteins
Biochem. J. 91, 201
63. Sherman, P.
(1961) The water binding capacity of fresh
pork
Food Technol. 15, 90
64. Sinell, H.-J.
(1961) Versuche zum biologischen Nachweis
hitzedenaturierter Muskelproteine
Zbl. Vet. Med. 8, 57
65. Sinell, H.-J.
(1962) Methoden zur Bestimmung der Fleisch-
art in Fleischwaren
Proc. 3rd Symp. World Assoc. Vet.
Food Hyg., Nice
66. Sinell, H.-J.
(1966) Immunologische Eigenschaften eini-
ger wasserlöslicher Muskeleiweiße
XIIth European Meeting of Meat
Research Workers, Sandefjord

67. Sinell, H.-J.
(1968) Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 121
68. Sinell, H.-J. u.
I. Mentz
(1969) Serologische Species-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82, 41
69. Stauff, J.
(1960) Kolloidchemie
Verl. Springer, Berlin
70. Šuvakov, M.,
V. Visacki,
M. Marinkov u.
S. Korolija
(1967) Die Abhängigkeit des Gehaltes der sauren Phosphatase von der thermischen Behandlung des gepökelten Schweinefleisches
XIIIth European Meeting of Meat Research Workers, Rotterdam
71. Taylor, J.F.,
A.A. Green u.
G.T. Cori
(1948) Cristalline Aldolase
J. Biol. Chem. 173, 591
72. Uhlenhuth, P.
(1901) Untersuchung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischschau
Dtsch. med. Wschr. 27, 780

73. Uhlenhuth, P. u. W. Seiffert
(1930) Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels Präzipitation
in: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen Bd. 3, 1, 365
Hrsg.v. Kolle, Kraus, Uhlenhuth
Verl. G. Fischer, Jena
74. Weber, H.H. u. R. Stöver
(1933) Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweißkörper
Biochem. Z. 259, 269
75. Weber, H.H.
(1934) Die Muskeleiweißkörper und der Feinbau des Skelettmuskels
Ergebn. Physiol. 36, 109
76. Weber, H.H.
(1950) Muskelproteine
Biochim. Biophys. Acta 4, 12

Zum Schluß danke ich meinem verehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. H.- J. Sinell, für das Thema
dieser Arbeit und für die mir jederzeit ge-
währte freundliche Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Am 25. November 1941 wurde ich, Rüdiger Schmoldt, als Sohn des Ingenieurs Adolf Schmoldt und seiner Ehefrau Helene in Berlin geboren.

Von 1947 bis 1949 besuchte ich die 19. Volksschule in Berlin-Friedenau und anschließend bis zum Jahre 1953 die Waldgrundschule in Berlin-Charlottenburg. Von 1953 an war ich Schüler der Waldoberschule in Berlin-Charlottenburg, an der ich am 3.3.1960 die Reifeprüfung bestand.

An der Technischen Universität Berlin studierte ich vier Semester Elektrotechnik und begann 1962 an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich am 18.10.1967 mit dem Staatsexamen abschloß.

Mein Veterinärpraktikum leistete ich an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere und im Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin ab und erhielt am 16. Juni 1968 die Bestallung als Tierarzt.

Zur Zeit bin ich als wissenschaftlicher Hilfsassistent im Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin beschäftigt.

Bönecke - Druck - Clausthal-Zellerfeld Postfach 29